

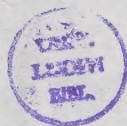
**NACHWEIS VON BOVINEM
CORONAVIRUS - ANTIGEN MITTELS ELISA
UND VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN
MIT ANDEREN NACHWEISVERFAHREN**

CHEN HUAN CHUN

1987

Disbui, München

1988





Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie
Infektions- und Seuchenmedizin
der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h. c. mult. A. Mayr

Nachweis von bovinem Coronavirus - Antigen mittels
Elisa und vergleichende Untersuchungen mit anderen
Nachweisverfahren.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität
München

von
Chen Huan Chun
aus
Wuhan, VR China
München 1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. U. Lösch

Tag der Promotion: 26. Februar 1988

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. <u>Einleitung</u>	1
2. <u>Schrifttum</u>	2
2.1. Coronaviren - eine kurze Einführung	2
2.2. Verbreitung und Bedeutung boviner Coronaviren (BCV)	4
2.3. Nachweis von BCV	7
2.3.1. Elektronenmikroskopie (EM) und Immunelektronenmikroskopie (IEM)	7
2.3.2. Hämagglutinations- (HA), Hämagglutinations- hemmungstest (HAH) und Hämadsorptions- Elutions-Hämagglutinationstest (HEHA)	9
2.3.3. Reverse passive Hämagglutination (RPHA)	9
2.3.4. Virusisolierung im Zellkultur	10
2.3.5. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)	10
3. <u>Eigene Untersuchungen</u>	12
3.1. Material und Methoden	12
3.1.1. Isolierung von BCV in Zellkultur	12
3.1.2. Produktion von Antikörpern	12
3.1.2.1. Antigenherstellung	12
3.1.2.2. Immunisierung von Hühnern	13
3.1.2.3. Extraktion von Antikörpern aus Dotter	13
3.1.2.4. Herstellung von Hyperimmunseren	14
3.1.2.5. Herstellung von monoklonalen Antikörpern	14
3.1.2.5.1. Immunisierung von Mäusen	14
3.1.2.5.2. Zellfusion	14
3.1.2.5.3. Gewinnung von Mäuseascites	15
3.1.2.6. Untersuchung von Dotterextrakt, Immunseren und monoklonalen Antikörpern	16
3.1.2.6.1. Neutralisationstest	16
3.1.2.6.2. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	16

3.1.3.	ELISA-Technik	17
3.1.3.1.	ELISA als Screening-Test zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern	17
3.1.3.2.	Bestimmung der Immunglobulin- Subklassen im ELISA	18
3.1.3.3.	Kompetitions-ELISA	19
3.1.3.4.	ELISA zum Nachweis von polyklonalen Antikörpern	19
3.1.4.	Reinigung von monoklonalen Antikörpern, Dotterantikörpern und Hyperimmunsere.	19
3.1.4.1.	Kaolin-Behandlung	20
3.1.4.2.	Protein-A-Affinitätschromatographie	20
3.1.4.3.	Präzipitation des Globulins aus Immunsere	21
3.1.5.1.	Herstellung von Peroxidase-Konjugaten	21
3.1.5.2.	Herstellung von Biotinkonjugaten	21
3.1.6.	Coronavirus-Antigennachweis mit ELISA-Technik	22
3.1.6.1.	Elisa mit Immunsere	23
3.1.6.2.	Elisa mit monoklonalen Antikörpern und Immunsere	24
3.1.6.3.	Hemmtest (Blocking-ELISA)	24
3.1.7.	HA Reaktion zum Nachweis von BCoV-Antigen	25
3.1.8.	Testantigene	25
3.1.9.	Weitere Charakterisierung der Antikörper durch Immunoblotting	25
3.1.9.1.	Elektrophoretische Auftrennung viraler Proteine	25
3.1.9.2.	Silberfärbung	26
3.1.9.3.	Immunoblotting	26
3.1.9.3.1.	Transfer von viralen Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen	26
3.1.9.3.2.	Nachweis der Bindung von polyklonalen Immunsere und MAK an immobilisierte BCoV-Proteine	27
3.2.	Versuche und Ergebnisse	28
3.2.1.	Virusisolierung in Zellkultur	28
3.2.2.	Herstellung von Antisere	29

3.2.2.1.	Dotterantikörper	29
3.2.2.2.	Immunseren	30
3.2.3.	Monoklonale Antikörper	31
3.2.3.1.	Herstellung monoklonaler Antikörper	31
3.2.3.2.	Reinigung von MAK aus Aszitesflüssigkeit	33
3.2.3.3.	Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen der MAK	34
3.2.3.4.	Kompetitions-Elisa	35
3.2.3.5.	Weitere Charakterisierung der MAK und Antiseren durch Immunoblotting	35
3.2.4.	Versuche zur Etablierung eines Elisa zum Nachweis von BCV-Antigen.	39
3.2.4.1.	Versuche mit polyklonalen Antiseren	39
3.2.5.	Versuche mit monoklonalen Antikörpern	39
3.2.5.1.	Plattenbeschichtung	39
3.2.5.2.	Nachweis-Antikörper	42
3.2.5.2.1.	Dotterantikörper	42
3.2.5.2.2.	Meerschweinchenimmunseren	42
3.2.5.2.3.	Kaninchenimmunseren	43
3.2.5.2.4.	Kaninchenimmunserum-Peroxidasekonjugat	43
3.2.5.2.5.	Biotinylierte MAK	43
3.2.5.3.	Nachweis der Spezifität des BCV-Nachweises im ELISA durch einen Hemmtest.	45
3.2.6.	Sensitivität des BCV-ELISA im Vergleich zur HA/HAH und dem EM	47
3.2.7.	Reaktivität von Coronaviren anderer Spezies im BCV-Elisa	48
4.	<u>Besprechung der Ergebnisse</u>	52
5.	<u>Zusammenfassung</u>	58
6.	<u>Literaturverzeichnis</u>	62

1. Einleitung

Am Entstehen von Durchfallerkrankungen beim neugeborenen Kalb können eine Vielzahl von Faktoren beteiligt sein. Zur Einleitung einer sinnvollen Therapie und Prophylaxe ist daher eine genaue Diagnose unerlässlich. Unter den möglichen infektiösen Ursachen finden sich neben Protozoen (Kryptosporidien) und einer Vielzahl verschiedener Bakterienarten (besonders enterotoxische E.coli) auch eine Reihe von Viren. Im Vordergrund stehen hier Rota- und Coronaviren. Die Diagnose der Protozoen- bzw. Bakterieninfektionen wird routinemäßig mikroskopisch bzw. kulturell gestellt. Auch der Nachweis von Rotavirusinfektionen ist durch eine Vielzahl von Verfahren in allen durchschnittlich ausgestatteten Laboratorien möglich. Dagegen ist der Nachweis einer Infektion mit bovinem Coronavirus (BCV) auch heute noch schwierig und anspruchsvoll. Da die angewandten Diagnoseverfahren nach wie vor spezialisierten Instituten vorbehalten sind, sind die Kenntnisse über die Verbreitung und Bedeutung dieser Viren immer noch lückenhaft. Ein Hauptanliegen der angewandten Virologie, die sich mit dem Problem der Durchfallerkrankungen beschäftigt, ist es daher, ein Verfahren zum Nachweis von BCV zu entwickeln, das dann auch in einem durchschnittlich ausgestatteten diagnostischen Labor benutzt werden kann.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, etablierte Techniken der BCV-Diagnostik zu vergleichen bzw. verbessern und einen ELISA zum Nachweis von BCV-Antigen in Kotproben zu entwickeln.

2. SCHRIFTTUM

2.1. Coronaviren - eine kurze Einführung

Bovine Coronaviren werden innerhalb der Familie Coronaviridae klassifiziert (Matthews, 1982). Morphologisch stellen die Virionen pleomorphe, meist rundliche Partikel mit einem Durchmesser von 75 -160nm dar. Die Partikel besitzen eine Hülle, von denen Projektionen ausgehen, deren Form am besten mit "tennischläger-ähnlich" beschrieben wird. Diese Projektionen sind ca. 10-24nm lang. Meist finden sich zwei Arten von Projektionen, kürzere mit 10nm Länge, sowie Projektionen mit ca. 17-24nm. Coronaviren besitzen eine einsträngige, lineare, nicht segmentierte RNS, deren Molekulargewicht von ca. $3,8 \times 10^6$ bei bovinen Coronaviren bis ca. $6,9 \times 10^6$ bei anderen Coronaviren variiert (Guy und Brian, 1979; Sidell et al., 1982). Ca. 2.400 Basen am 3' Ende der RNS vom bovinen Coronavirus Stamm NCDCV wurden kürzlich kloniert und sequenziert (Lapps et al., 1987). Innerhalb dieser Region liegen die Gene für das Nukleokapsid- und das Matrixprotein. Diese Proteine besitzen nach diesen Autoren Molekulargewichte von 49kD und 26 kD. Hogue et al. (1984) beschreiben Proteine von ähnlicher Größe in BCV-Virionen, die sie mit Gelelektrophorese und Immunoblotting nachweisen. Das größere (52 kD) Nukleoprotein ist phosphoryliert, während das kleinere Matrixprotein glykosyliert ist. Darüber hinaus beschreiben diese Autoren ein 190kD Glykoprotein, das meist in Untereinheiten von 100 kD und 120kD vorliegt, sowie ein 140 kD Glykoprotein. Dieses gp 140 stellt das Hämagglutinin von BCV-Virionen dar. Ein ähnliches Proteinemuster besitzen auch humane Coronaviren, die mit dem Referenzstamm OC-43 verwandt sind. Dagegen fehlt das Hämagglutinin bei den Mäusehepatitisviren. Zwischen Coronaviren, die von verschiedenen Spezies isoliert worden sind, besteht eine unterschiedliche Antigenverwandtschaft. Aufgrund von Ergebnissen, die mit dem Neutralisationstest, der Immunofluoreszenz, der Hämagglutinationshemmung, Immunelektronenmikroskopie sowie

Immunoblotting erzielt wurden, lassen sich die Coronaviren der Säugetiere und des Menschen in mindestens zwei antigene Gruppen einteilen (Pedersen et al., 1978; Wege et al., 1982):

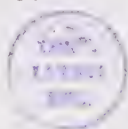
Zur ersten Gruppe gehören die Mäusehepatitisviren (MHV), das humane Coronavirus OC43 (HCV-OC43), das hämagglutinierende Enzephalomyelitis Virus des Schweines (HEV), Coronaviren der Ratten (RCV) und BCV.

Zur zweiten Gruppe werden dagegen das humane Coronavirus 229E (HCV-229E), das Virus der feline infektiösen Peritonitis (FIPV), das Virus der übertragbaren Gastroenteritis des Schweines (TGEV) sowie Coronaviren des Hundes (CCV) gerechnet.

Das porcine epidemische Diarrhoevirus (PEDV) läßt sich bisher keiner dieser beiden Gruppen zuordnen (Pensaert et al., 1981).

Diese Ergebnisse serologischer Untersuchungen wurden durch den direkten Vergleich der Aminosäuresequenzen unterstützt. So besitzen nach Lapps et al. (1987) BCV und MHV im Nukleokapsid- und Matrixprotein eine Homologie von 70% bzw. 87%.

Innerhalb der vom Rind isolierten Coronaviren wurden bisher keine antigenetisch unterscheidbaren Subtypen gefunden, serologisch verhalten sich alle BCV-Isolate identisch (Garwes, 1982). Dagegen finden sich bei einigen Stämmen biologische Unterschiede. Einige BCV Isolate besitzen hämagglutinierende Eigenschaften bei 37°C (Sato et al., 1977; Lu, 1985), während andere Isolate bei dieser Temperatur von den Erythrozyten eluieren (Ellens et al., 1978). Auch gegenüber der Behandlung im sauren Milieu bei pH 3 ist ein unterschiedliches Verhalten einzelner Isolate beschrieben (Lu, 1985). Die Titerreduktion nach dreistündiger Behandlung bei pH 3,0 lag zwischen 0,86 und $>5,2 \log_{10} \text{KID}_{50}$. Ob diese unterschiedlichen



biologischen Verhaltensweisen mit einer unterschiedlichen Pathogenität einhergehen ist nicht bekannt.

2.2. Verbreitung und Bedeutung boviner Coronaviren

BCV wurde erstmals 1972 durch Stair et al. beschrieben und morphologisch charakterisiert, ein Jahr später gelang Mebus et al. (1973) die Isolierung eines cytopathogenen BCV-Stammes (NCDCV). Dieser Stamm wird auch heute noch als Referenzstamm verwendet. Inzwischen wurde - mit unterschiedlichen Nachweismethoden - BCV in fast allen Erdteilen nachgewiesen, so daß von einer weltweiten Verbreitung ausgegangen werden kann (Lit. bei Lu, 1985). In Kotproben von durchfallkranken Kälbern wird BCV relativ häufig nachgewiesen. Marsolais et al. (1978) fanden BCV in 11% aller untersuchten Proben. In einer neueren Arbeit berichten Baljer et al. (1987) über ein Proben-volumen aus über 2 Jahren. Innerhalb dieses Zeitraums wurden ebenfalls in 11% der Proben BCV mit Hilfe der HA/HAH-Reaktion nachgewiesen. Dabei konnte keine signifikante jahreszeitliche Häufung des BCV-Nachweises festgestellt werden, auch eine Abhängigkeit vom Alter der durchfallkranken Kalber wurde nicht beobachtet. Dagegen hat der Zeitpunkt der Probenentnahme nach Einsetzen des Durchfalls offensichtlich einen großen Einfluß auf die Diagnose der BCV-Infektion, zumindest mit der HA/HAH-Technik. Während bei 21% der Proben, die zwei bis drei Tage nach Einsetzen der klinischen Symptome gezogen worden waren, BCV mit der HA/HAH nachweisbar war, sank der Anteil bei Proben, die vier bis fünf Tage nach Beginn des Durchfalls entnommen worden waren, auf 11%. Wurden die Proben erst nach sechs Tagen oder noch später gewonnen, lag die Nachweisrate nur noch bei 5%. Bei der Durchfallerkrankung des neugeborenen Kalbes werden Mischinfektionen mit Corona-, Rotaviren, enterotoxischen E.coli und Kryptosporidien häufig beobachtet (Baljer und Bachmann, 1980; Reynolds et al., 1986; Snodgrass et al., 1986). Dabei scheinen gleichzeitige Infektionen mit BCV und Rotavirus besonders häufig zu sein.

Nach Baljer et al. (1987) werden bei 18 - 40% der BCV-positiven Proben Mischinfektionen mit Rota- und Coronaviren nachgewiesen. Der Anteil der Proben, in denen mehr als ein Erreger nachgewiesen wurde, lag in dieser Untersuchung bei 14 % des ausgewerteten Materials; dabei lag der Anteil der Proben, bei denen keine mikrobiologische/parasitologische Diagnose gestellt werden konnte bei 50%.

Zu ähnlichen Ergebnissen kommen auch Nagy et al. (1986) bei einer Untersuchung an durchfallkranken Kälbern aus ungarischen Großbetrieben. Auch diese Autoren betonen die Bedeutung von Mischinfektionen in der Ätiologie von Durchfallerkrankungen. Coronaviren wurden in dieser Untersuchung in 15% der untersuchten Proben nachgewiesen. Möstl et al. (1984) untersuchten 294 Kotproben von 30 Kälbern, die gesund bzw. an Durchfall erkrankt waren. Dabei fanden sie in 12,9% der Proben Coronavirus, wobei zwischen dem Auftreten von Durchfall und dem Nachweis von BCV eine hohe Korrelation bestand. Rotaviren wurden ca. doppelt so häufig nachgewiesen, auch in Proben gesunder Kälber. Daher schließen die Autoren auf eine geringe Relevanz von Rotaviren in der Ätiologie neonataler Diarrhoen. Allerdings ist das in dieser Arbeit verwendete kommerzielle Rotavirusnachweisverfahren für seine häufigen falsch positiven Reaktion bekannt (Krause et al., 1983; Rotbart et al, 1985), was den Wert dieser Aussage schmälert.

Die weite Verbreitung boviner Coronaviren wurde auch durch serologische Untersuchungen, also den Nachweis von Antikörpern, bestätigt (Sato et al., 1981; Lu, 1985). Antikörper gegen BCV werden danach in nahezu allen (96,5% - 100%) untersuchten Seren von Rindern nachgewiesen. Auch bei einer Reihe anderer Spezies werden solche Antikörper mit unterschiedlich hoher Durchseuchungsrate gefunden. Lediglich bei Hamstern und Ziegen sowie bei Hühnern konnten keine Antikörper gegen BCV nachgewiesen werden. Dagegen sind, in Übereinstimmung mit Storz und Rott (1981), ein hoher Prozentsatz der untersuchten menschlichen Seren positiv. Nicht klar ist bis heute,

woher diese Antikörper stammen. Denkbar ist, daß es sich um Antikörper gegen humane respiratorische Coronaviren, wie den Stamm OC-43, handelt, der ja mit BCV verwandt ist und so eine Kreuzreaktion der Serumantikörper erklärt werden kann (Czerny, 1986).

Möglich ist auch, daß diese Antikörper gegen humane enterische Coronaviren (HECV) gerichtet sind. Diese Viren scheinen antigenetisch ebenfalls mit HCV-OC43 verwandt zu sein (Battaglia et al., 1987).

Schließlich ist aber auch die Möglichkeit eines pathogenen Potentials von BCV für den Menschen, also eine Bedeutung als Zoonoseerreger, nicht völlig auszuschließen. Storz und Rott (1981) berichten, daß ein Tierpfleger, der experimentell mit BCV-infizierte Kälber betreute, an Durchfall erkrankte. In Stuhlproben wurden Coronaviren gefunden, die von menschlichen Seren sowie von Rinderseren komplexiert wurden.

Ebenfalls unklar ist bisher, ob Coronaviren auch bei erwachsenen Rindern enteropathogen sein können. So liegen Berichte über den elektronenoptischen Nachweis von Coronaviren oder Coronavirus-ähnlichen Partikeln ("coronavirus-like-particles") im Kot erwachsener Rinder vor (Horner et al. 1976; Takahashi et al., 1980; Espinasse et al., 1982). Eine erfolgreiche Virusisolierung aus derartigem Material wurde dagegen nur von Akahashi et al. (1981) beschrieben. Das Kakegawa-Isolat ließ sich in foetalen Rindernierenzellen vermehren und besaß morphologische und biochemische Eigenschaften von BCV. Es häm-agglutinierte Rattenerythrozyten und ist serologisch mit dem NCDCV sehr nahe verwandt. Die Relevanz dieser Befunde ist unklar, da weitergehende Untersuchungen fehlen.

Außerdem liegen Berichte vor, die eine subklinische Infektion mit Virusausscheidung im Kot bei gesunden erwachsenen Rindern beschreiben (Dea et al., 1979). Diese Beobachtung erschwert zwar die Bewertung von BCV als potentielles pathogenes Agens für ältere Tiere, sie gibt dafür aber eine mögliche Erklärung für das häufige Vorkommen bei neugeborenen Kälbern sowie die meist enzootische Seuchenslage. Neugeborene kommen demnach bereits kurz nach

der Geburt mit dem Virus in Kontakt und werden möglicherweise infiziert. Ob die Infektion dann zu einer Erkrankung führt, ist letztlich von einer Reihe anderer Faktoren abhängig, z.B. von der Menge kolostraler Antikörper sowie der Dauer ihrer Aufnahme, und insbesondere dem Vorhandensein anderer Mikroorganismen (Garwes, 1982). Dieses Konzept einer multifaktoriellen Ätiologie infektiöser Durchfallerkrankungen, insbesondere der schweren klinischen Formen, wird durch experimentelle Untersuchungen mit Rotaviren und enterotoxischen E.coli nachhaltig unterstützt (Snodgrass et al., 1983; Hess et al., 1984). BCV wird beim Kalb fast ausschließlich aus dem Intestinaltrakt isoliert, es liegen nur wenige Berichte über eine Virusisolierung aus dem Respirationstrakt vor (Thomas et al. 1982; McNulty et al., 1984). Experimentelle Infektionen neugeborener Kälber mit solchen respiratorischen Isolaten führten zu milden Affektionen der oberen Atemwege. Diesen Beobachtungen waren Ergebnisse von Stott et al. (1976) sowie Bridger et al. (1978) vorgegangen, die eine Vermehrung von BCV-Stämmen, die aus dem Kot durchfallkranker Kälber stammten, in Organkulturen der Trachea von Rinderfeten beschreiben. Die Relevanz dieser Befunde ist jedoch noch nicht klar, da weitere Untersuchungen bisher nicht durchgeführt wurden.

2.3. Nachweis von BCV

Die zur Diagnose von BCV verwendeten Verfahren sind kürzlich von Lu (1985) eingehend beschrieben worden. Über eine Verbesserung dieser Techniken bzw. über die Etablierung neuer Methoden zum BCV-Nachweis ist in der Zwischenzeit nur wenig berichtet worden. Daher sollen die etablierten Techniken in der Folge nur kurz geschildert und bewertet werden.

2.3.1. Elektronenmikroskopie und Immunelektronenmikroskopie.

Nach wie vor stellt der direkte Nachweis von BCV-Partikeln im Elektronenmikroskop (EM) bzw. mit der Immun-

elektronenmikroskopie (IEM; Almeida und Waterson, 1969) wohl das weltweit am häufigsten angewandte diagnostische Verfahren dar. Beide Techniken besitzen eine Reihe von Vorteilen gegenüber anderen Methoden, allerdings auch mindestens ebensoviele Nachteile.

Der direkte Virusnachweis im EM stellt eine sehr rasche Methode der Diagnostik dar, ein Ergebnis kann innerhalb weniger Stunden erzielt werden. Zudem können mit dem EM alle in Frage kommenden enterischen Viren nachgewiesen werden. Dies ist besonders von Bedeutung bei solchen Viren, für die es kein anderes Nachweisverfahren gibt und deren Bedeutung bei Tieren bisher noch unklar ist. Dazu zählen z.B. Toroviren (Woode et al., 1982; Horzinek und Weiss, 1984), Astro- und Caliciviren (Woode und Bridger, 1978) sowie eine Reihe virus-ähnlicher Partikel (Dea et al., 1983; Timoney et al., 1983).

Die IEM-Technik, also die Komplexierung von Virionen durch ein spezifisches Antiserum, ermöglicht darüber hinaus eine serologische Diagnose, dies ist besonders bei der Suche nach antigenetischen Unterschieden bei nicht-kultivierbaren enterischen Viren von Bedeutung (Zissis und Lambert, 1978).

Ein Nachteil des EM ist der hohe apparative Aufwand sowie die recht subjektive Beurteilung, besonders bei Coronaviren. Hier bereitet oft die Abgrenzung "echter" Coronaviren von den "coronavirus-like-particles", die in Kotproben sehr häufig zu finden sind, Schwierigkeiten. Das EM ist außerdem ein relativ unempfindliches Nachweisverfahren. Die Nachweisgrenze liegt bei ca.

10^6 Partikel/ml, daher müssen die zu untersuchenden Proben meist in der Ultrazentrifuge konzentriert werden (Davies, 1982). Zusätzlich erschwert wird der direkte Nachweis von BCV, wenn Kotproben längere Zeit ungekühlt lagern, wie z.B. beim Versand an das Untersuchungsinstitut, da es hier zu schweren morphologischen Schädigungen kommt (von Reynolds et al. (1984) als "Waterloo Station effect" beschrieben). Schließlich können im EM

auch nur wenige Proben pro Tag untersucht werden, was den Nachweis von BCV äußerst kostspielig macht.

2.3.2. Hämagglutinations-(HA),
Hämagglutinationshemmungstest (HAH) und
Hämadsorptions-Elution-Hämagglutinationstest
(HEHA)

Hämagglutinierende Aktivitäten von BCV mit Erythrozyten von Mäusen, Ratten und Hamstern wurden von Sharpee et al. (1976) beschrieben. Die Autoren etablierten darauf ein Nachweisverfahren für BCV, bei dem die Spezifität der HA durch eine Hämagglutinationsreaktion(HAH) nachgewiesen wird.

Ellens et al. (1978) beschreiben einen weiteren Test (HEHA) bei dem Kotproben zunächst an Mäuseerythrozyten bei 4°C adsorbiert werden. Das adsorbierte Virusmaterial wird dann bei 37°C eluiert und erneut in einer HA bei 4°C getestet. HA positive Proben werden dann wiederum einer HAH unterzogen.

Weder die HAH noch die HEHA konnten sich als Verfahren zur Routinediagnostik durchsetzen. Mit dafür verantwortlich sind vor allem unspezifische HA-Reaktionen sowie Hämagglutination durch andere Viren, z.B. bovine Parvo- oder Enteroviren. Dies erschwert die Auswertung dieses Nachweisverfahrens und erfordert zudem eine Vielzahl spezifischer Antiseren. Außerdem bestehen offensichtlich Unterschiede in der HA Reaktion einzelner Isolate bei verschiedenen Temperaturen.

2.3.3. Umgekehrte passive Hämagglutination (RPHA)

Der RPHA-Test beruht auf folgendem Prinzip: Erythrozyten werden mit Glutaraldehyd fixiert und dann sensibilisiert (meist mit Tannin), so daß spezifische Antikörper an ihre Oberfläche gebunden werden können. Mit diesen Erythrozyten kann nun eine HA-ähnliche Reaktion durchgeführt werden, die aber nicht auf den hämagglutinierenden Eigenschaften einer Virusspezies, sondern auf der Reaktion der gebundenen Antikörper beruht. Solche Nachweisverfahren

wurden u.a. für Rotaviren (Sanekata et al., 1979; Hübert, 1985) und bovine Coronaviren (Sato et al., 1984) beschrieben. Diese Technik besticht zwar durch ihre rasche Durchführbarkeit, bereitet aber in der praktischen Anwendung Schwierigkeiten. So verwendeten Sato et al. (1984) Antikörper, die über Affinitätschromatographie an BCV-Proteinen gereinigt worden waren. Die Autoren erzielten dann aber bei 13 von 22 untersuchten Proben positive Ergebnisse, während mit der IF nur 3 und im EM nur 2 Proben positiv waren. Hier liegen möglicherweise falsch-positive Befunde vor, die durch unspezifische bzw. durch HA-Aktivitäten anderer Viren verursacht waren. Solche Beobachtungen machte auch Hübert (1985) bei der RPHA zum Nachweis boviner Rotaviren.

2.3.4. Virusisolierung in Zellkultur

Verfahren zur Isolierung von BCV in Zellkulturen sind kürzlich von Lu (1985) eingehend beschrieben worden. Seither liegen keine neuen Veröffentlichungen zu diesem Themenkomplex vor. Nur Fenner et al. (1987) beschreiben die Virusisolierung in bovinen Zellen oder in der Vero-Zelllinie und Nachweis der Virusvermehrung mit Hämadsorption als Routineverfahren, nähere Angaben geben die Autoren allerdings nicht.

Dennoch sollte in dieser Arbeit versucht werden, die Effizienz des Nachweises von BCV durch Isolierung in Zellkulturen zu erhöhen.

2.3.5. Enzyme-linked-immunosorbent-assay (ELISA)

Elisa-Verfahren zum Nachweis von BCV in Kotproben sind sowohl auf der Basis polyklonaler Antiseren (Ellens et al., 1978; Reynolds et al., 1984) als auch mit monoklonalen Antikörpern beschrieben (Crouch et al., 1984). ELISA-Techniken mit polyklonalen Antiseren erfordern hochgereinigte Immuneren, am besten von SPF-Tieren. Dies erfordert einen sehr hohen Aufwand. Zusätzlich erschwert wird die Herstellung solcher Seren durch das ubiquitäre Vorkommen von Rotaviren. Eine Infektion erfolgt i.d.R. bei

der Geburt und gebildete anti-Rotavirus-Antikörper kontaminieren das Immunsrum. Das Ergebnis sind dann wiederum falsch positive Ergebnisse (Crouch et al., 1984; Bachmann und Hess, pers. Mitteilung, 1985). Die Verwendung monoklonaler Antikörper (MAK) umgeht solche Probleme. Ein solches Verfahren zum Nachweis von BCV beschrieben Crouch und Mitarbeiter 1984. Als Fangantikörper verwendeten sie zwei MAK, die gegen das 52K bzw. gegen das 120K Protein gerichtet sind. Zur Plattenbeschichtung wurde zunächst anti-Maus-IgG aufgetragen und dann die MAK zugegeben. Zum Nachweis der Bindung von BCV an die MAK wurde ein Peroxidase-konjugiertes Kaninchenhyperimmunserum verwendet. Die Autoren berichten über sehr niedrige Hintergrundreaktionen. Außerdem ergab sich eine hohe Korrelation zwischen dem BCV-Nachweis im Kot und klinischem Bild nach experimenteller Infektion gnotobiotischer Kälber. Leider liegen keine weiteren Untersuchungen mit diesem Verfahren vor.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Isolierung von BCV in Zellkultur

Versuche zur Virusisolierung in Kälberhoden (KH) und Kälberlungenzellen (KL) wurden nach den von Lu (1985) und Czerny (1986) beschriebenen Verfahren durchgeführt. Zur Trypsinbehandlung der Zellkulturen wurde azetyliertes Trypsin (Sigma, München) verwendet; die Behandlungszeiten sowie die Trypsin-Konzentrationen wurden variiert.

3.1.2. Produktion von Antikörpern

Polyklonale Antikörper werden meist aus dem Serum immunisierter Tiere gewonnen. In dieser Arbeit wurde zusätzlich versucht, polyklonale Antikörper aus dem Dotter von immunisierten Hühnern zu extrahieren. Dazu wurde die Methode nach Bade und Stegemann (1984) verwendet, zum Teil mit kleineren Modifikationen.

3.1.2.1. Antigenherstellung

Als Antigen wurde der Corona-Virusstamm München V270/83 in der 18. KL-Passage benutzt. Nach Auftreten von cytopathischen Veränderungen in der Zellkultur (nach ca. 3-5 Tagen) wurden die Kulturen einmal gefriergetaut ($-20^{\circ}\text{C}/+25^{\circ}\text{C}$). Zur Entfernung von Zelltrümmern wurde das Material 60 Minuten bei 6.000g und 4°C zentrifugiert. Der HA-Titer des Überstands betrug 1:128 - 1:256.

Anschließend wurde der Überstand in einem Beckman SW28-Rotor 60 Minuten bei 28.000 Upm sedimentiert. Das Sediment wurde in einer geringen Menge TEN-Puffer (0,02M Tris-HCl (pH 7,6), 0,15M NaCl, 1mM EDTA) aufgenommen. 0,5 ml des suspendierten Sediments wurden nun auf 4,5 ml eines linearen 20 - 60%igen (w/w) Sucrosegradienten aufgetragen und 180 Min. bei 30.000 Upm und 4°C in einem SW56-Rotor zentrifugiert. Die deutlich zu erkennenden Virusbanden wurden seitlich durch Punktion entnommen. Die Sucrosekonzentration der Virusbande wurde mit einem Refraktome-

ter überprüft und betrug regelmäßig ca. 35%. Diese Fraktion wurde 1:10 mit TEN-Puffer verdünnt und 60 Minuten bei 40.000 Upm sedimentiert. Das Viruspellet wurde erneut in TEN-Puffer suspendiert und bis zur Verwendung bei -70°C gelagert.

3.1.2.2. Immunisierung von Hühnern

Vier Hühner wurden mit BCV-Sediment immunisiert und viermal im Abstand von einem Monat reimmunisiert. Bei jeder Immunisierung wurde 0,2ml Virusmaterial (HA-Titer >1:60.000) emulgiert in 0,2 ml komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA, Behringwerke, Marburg), intrakutan oder subkutan injiziert. Zehn Tage nach jeder Reimmunisierung wurden zwei Eier zur Kontrolle des Antikörperstatus entnommen. Fünfzehn Tage nach der dritten Reimmunisierung wurde außerdem jedem Huhn Blut zur Kontrolle des Antikörperstatus entnommen.

3.1.2.3. Extraktion von Antikörpern aus Dotter

Der Dotter wurde mit einem Haushalts-Eiertrenner gewonnen, in einer Petrischale mit aqua dest vorsichtig gewaschen, um das Eiweiß möglichst quantitativ zu beseitigen. Drei bis fünf Eier wurden jeweils gemeinsam verarbeitet. Die Dotter wurden ohne Membran langsam in eine Flasche mit 50 ml eiskaltem Isopropanol gegossen. Dann wurde die Flasche kräftig geschüttelt und 3-5 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Sediment mit der gleichen Menge Isopropanol aufgenommen und geschüttelt. Dann wurden die Dotter zweimal wie oben, jedoch mit Azeton, behandelt, schließlich auf einem Buchner-Trichter mit Filterpapier und angeslossenem Vakuum gesammelt, mit einer kleinen Menge Azeton gewaschen und dann im Luftstrom der Vakuumpumpe getrocknet. Das getrocknete Pulver wurde in 0,01M Phosphatpuffer (pH 7,5) mit 0,1M NaCl und 0,01 % NaN_3 (5-10 ml per Dotter) aufgenommen und eine Stunde bei Raumtemperatur gerührt. Die Emulsion wurde dann 30 Minuten

bei 2.200g zentrifugiert. Die Überstände wurden bei 4°C aufbewahrt.

3.1.2.4. Herstellung von Hyperimmunseren

Verwendet wurden je zwei Kaninchen und Meerschweinchen, die keine Antikörper gegen BCV V270/83 aufwiesen. Zur ersten und zweiten Immunisierung wurden 0,4 ml BCV V270/83 Sediment (HA-Titer 1:60.000), mit der gleichen Menge CFA gemischt, verabreicht. Für weitere Immunisierungen wurde Gradientengereinigtes Virusmaterial, ebenfalls mit der gleichen Menge CFA emulgiert, appliziert. Zwei Wochen nach der 4. bzw. 5. Immunisierung wurde Blut durch Herzpunktion gewonnen.

3.1.2.5. Herstellung von monoklonalen Antikörpern

3.1.2.5.1. Immunisierung von Mäusen

Zur Immunisierung wurden 8-12 Wochen alte Balb/c-Mäuse ohne Antikörper gegen BCV V270/83 verwendet. Alle Mäuse wurden mindestens dreimal im Abstand von 21 Tagen mit 0,1 ml - 0,2 ml gradientengereinigtem BCV-270 Virus - Material, gemischt mit der gleichen Menge CFA, immunisiert. Die letzte Immunisierung wurde 4 Tage vor der Fusion mit 0,2 ml gradientengereinigtem Virusmaterial ohne Adjuvans entweder intraperitoneal oder intravenös durchgeführt.

3.1.2.5.2. Zellfusion

Milzzellen immunisierter Mäuse wurden mit der Mäuse-myelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et.al., 1979) fusioniert. Dabei wurde die von Czerny (1986) beschriebene Methode angewandt.

Die fusionierten Hybridoma-Zellen wurden in HAT-Selektivmedium aufgenommen, in Flachbodenplatten ausgesät und nach 10 Tagen das Kulturmedium gewechselt. Aus den Vertiefungen mit Koloniewachstum wurden ungefähr fünfzehn Stunden nach dem letzten Mediumwechsel die Zellkultur-Überstände teilweise abgenommen und im Elisa auf virus-

spezifische Antikörper untersucht. Kolonien, die Antikörper sezernierten, wurden vermehrt und dann mit der limiting-dilution-Technik in Mikroplatten kloniert. Die Zellkulturüberstände von Vertiefungen, in denen nur eine Kolonie gewachsen war, wurden schließlich wiederum auf Antikörperproduktion im Elisa untersucht. Positive Kulturen wurden weiter vermehrt und dann eingefroren. Dazu wurden die Zellen (10^7 /ml) in Dulbecco-Medium (DMEM) mit 10% FKS und 7,5% DMSO (Dimethylsulfoxid; Serva, Heidelberg) aufgenommen, in Ampullen á 1 ml abgefüllt und bei -196°C tiefgefroren.

Um serumfreie Zellkulturüberstände zu gewinnen, wurden die Klone zunächst vermehrt, dann das Erhaltungsmedium entfernt und durch DMEM ohne FKS ersetzt. Nach vier bis sieben Tagen wurden die Kulturen abgeschüttelt und bei 2200g 30 Minuten abzentrifugiert. Die Überstände wurden im Elisa untersucht und bei -20°C konserviert.

3.1.2.5.3. Gewinnung von Mäuseaszites

Um größere Mengen monoklonaler Antikörper zu bekommen wurden BCV-Antikörper-positive klonierte Hybridomzellen in der Peritonealhöhle von Balb/c Mäusen vermehrt. Die Mäuse waren 10 - 21 Tage vorher mit 0,5 - 1 ml Pristane (2.6.10.14 Tetramethyl-Pentadecan; Aldrich, Steinheim) intraperitoneal vorbehandelt worden. Dann wurden jeder Maus ca. 10^7 Hybridomzellen i.p. injiziert. Nach etwa 7 Tagen wurde die Bauchhöhle mit einer weitlumigen Kanüle (Nr. 21) punktiert. Bis zum Versiegen der Aszitesproduktion wurden weitere Punktionen im Abstand von zwei Tagen durchgeführt. Der Aszites wurde bei 2200g 20 Minuten zentrifugiert, bei -20°C über 12-24 Stunden gefroren, auf-

getaut, nochmals zentrifugiert, und dann der Überstand in kleinen Portionen abgefüllt und bei -20°C aufbewahrt.

3.1.2.6. Untersuchung von Dotterextrakt, Immunseren und monoklonalen Antikörpern.

3.1.2.6.1. Neutralisationstest

Der Serumneutralisationstest wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Seren und Mäuseasziten wurden vor dem Test 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. Als Testvirus wurde BCV V270/83 in der 18. Passage auf Kälberlungenzellkulturen verwendet. Als Zellkulturmedium diente Earle's MEM (EMEM). Für jede Probe wurden zwei Verdünnungsreihen (Endvolumen 50 μl in EMEM) in log 2-Schritten auf der Platte angelegt, dann je 50 μl Virus (eingestellt auf 100 KID₅₀ / 50 μl) dazugegeben, die Platten geschüttelt und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden in jede Vertiefung der Mikrotiterplatten 100 μl einer Suspension von sekundären Kälberlungenzellen (in EMEM mit 5% FKS) pipettiert. Bei jedem Versuchsansatz wurden eine Virusrücktitration, Serumkontrolle, Zellkontrolle, sowie bekannt positive und negative Seren mitgeführt. Nach einer Bebrütungszeit von 7 Tagen bei 37°C in Luft mit 5% CO_2 wurden die Tests durch Beurteilung des cpE abgelesen. Als Titer wurde die höchste Serumverdünnung angesehen, bei der beide Vertiefungen keinen cpE zeigten.

3.1.2.6.2. Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

Dotterextrakte, Immunseren und Hybridomazellkulturen wurden auf das Vorhandensein hämagglutinationshemmender Antikörper gegen BCV V270/83 untersucht. Der Test wurde nach Standardverfahren im Mikrotitersystem mit Rundbodenplatten durchgeführt. Vor der Untersuchung wurden die Seren und Asziten 30 Minuten bei 56°C inaktiviert. Der Dotterextrakt wurde mit Kaolin behandelt und mit Ratten-Erythrozyten absorbiert. Anschließend wurden je 50 μl der Proben auf der Mikroplatte in log₂-

Schritten mit NaCl-Phosphatpuffer, dem 1% FKS zugesetzt war, verdünnt. Nun wurde BCV V270/83, dessen Aktivität auf 4 hämagglutinierende Einheiten eingestellt worden war, in einer Menge von 50 µl pro Vertiefung zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 60 Minuten bei 37°C wurden 50 µl einer 0,5%igen Rattenerythrozytensuspension zugetropft. Die Platten wurden anschließend geschüttelt und 3 Stunden bei Zimmertemperatur belassen. Als HAH-Titer wurde die höchste Serumverdünnung angegeben, bei der die Hämagglutination noch vollständig gehemmt war.

3.1.3. Elisa-Technik

3.1.3.1. Elisa als Screening-Test zum Nachweis von monoklonalen Antikörpern

Ein indirekter Elisa wurde als Screening-Test zum Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen BCV in Hybridoma-Zellkulturüberständen eingesetzt. Der Coronavirusstamm V270/83 wurde an Mikrottestplatten gebunden, die Lochreihen mit den zu untersuchenden Proben inkubiert und die Antigen-Antikörper-Bindung mit einem enzymgekoppelten anti-Mäuse-Globulin nachgewiesen. Die Sichtbarmachung gebundener Antikörper erfolgte mit der photometrisch auswertbaren Enzym-Substratreaktion. Der BCV-Elisa wurde in Anlehnung an den von Bachmann (1979) beschriebenen Elisa zum Rotavirusnachweis in Kälberkotproben durchgeführt. Als Antigen diente der in sekundären KL-Zellkulturen gezüchtete Coronavirusstamm München V270/83 in der 18. Zellkulturpassage. Die Beschichtung der Mikroplatten (Immuno II, Nunc, Wiesbaden) erfolgte mit 100 µl pro Loch einer 1:400 Verdünnung des BCV-Sediments in Karbonat-Bikarbonatpuffer (pH 9,6) und anschließender Inkubation während 3 Stunden bei 37°C, dann über Nacht bei 4°C. Beschichtete Platten lagerten nur kurze Zeit bei 4°C. Wenn größere Mengen Platten beschichtet wurden, wurden diese bei -20°C aufbewahrt. Vor dem Test wurden die Platten dreimal mit NaCl-Phosphat-Puffer (NaCl-PP), dem 0,05% Tween 20 zugesetzt worden war, gewaschen und gründ-

lich trockengeschüttelt. Zur vollständigen Abbildung aller Bindungskapazitäten des Plastikmaterials der Platten wurden alle Vertiefungen mit 10% FKS in NaCl-PP (0,1 ml) beschichtet, und bei 37°C für eine Stunde bebrütet. Nun folgte erneutes Waschen und Beschicken der Vertiefungen mit 100µl NaCl-PP mit 5% FKS. Die zu untersuchenden Proben wurden dann auf der Platte in log-2-Schritten verdünnt. Als Kontrolle lief jeweils ein anti-BCV V270/83-positives Mäuse-Serum und ein negatives Serum mit. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurden die Platten wieder dreimal gewaschen, trockengeschüttelt, und dann je 100µl eines Kaninchen-anti-Maus-Ig-Meerrettichperoxidase-Konjugates (Dako, Hamburg; Verdünnung 1:1000 in NaCl-PP mit 5% FKS) zugegeben. Nach einer Bindungszeit von 40 Minuten bei 37°C und erneutem dreimaligen Waschen und Trockenschütteln erfolgte die Zugabe von 0,1 ml Enzymsubstrat (0,005% H_2O_2 mit 0,05% o-phenylendiamin als Indikator in 0,02M Citrat/0,05M Phosphat). Die Platten wurden 10 Minuten geschüttelt, dann 20 Minuten bei Zimmertemperatur belassen, und anschließend die Extinktion bei 450 nm in einem Multiscan-Photometer (Flow Laboratories, Bonn) gemessen. Als positiv wurden die Verdünnungen gewertet, deren Extinktion mindestens um 0,15 höher war als der Wert der negativen Kontrolle.

3.1.3.2. Bestimmung der Immunglobulin-Subklassen im Elisa

Die Immunglobulin-Subklassen monoklonaler Antikörper wurden ebenfalls mittels Elisa untersucht. Dazu wurden die Platten mit serumfreien Zellkulturüberständen (1:2 verdünnt in Karbonat-Bikarbonatpuffer, pH 9,6) beschichtet. Zum Nachweis des Isotyps der monoklonalen Antikörper wurden subklassenspezifische Antiseren von der Ziege (Sigma, München) eingesetzt. Die Antiseren wurden 1:400 in NaCl-PP mit 5% FKS verdünnt und dann mit anti-Ziege-Ig-

Peroxidase-Konjugat nachgewiesen. Alle Inkubations- und Waschschrirte erfolgten wie oben beschrieben.

3.1.3.3. Kompetitions-Elisa

Zur weiteren Charakterisierung der monoklonalen Antikörper gegen BCV wurde ein Kompetitions-Elisa durchgeführt. Als Antigen zur Plattenbeschichtung diente BCV V270/83 Sediment. Die Asziten wurden 1:5 verdünnt, und dann in einer HA-Platte in log - 2 Schritten in NaCl-PP mit 5% FBS in 50 µl Mengen verdünnt. Dann wurden zu den Verdünnungen 50 µl des konkurrierenden, vorher peroxidasemarkierten bzw. biotinylierten MAK zugegeben, die Platten kurz geschüttelt und auf die mit Antigen beschichtete Elisa-Platte umgesetzt. Für jede Probe wurden zwei Reihen angelegt und entsprechende Kontrollen miteinbezogen.

3.1.3.4. Elisa zum Nachweis von polyklonalen Antikörpern

Zum Nachweis BCV - spezifischer Antikörper im Dotterextrakt bzw. im Serum immunisierter Kaninchen und Meerschweinchen wurde ebenfalls ein indirekter Elisa durchgeführt. Die Methodik entsprach dem oben beschriebenen indirekten Elisa. Da kein anti-Huhn-Immunglobulinkonjugat erhältlich war, wurde ein Kaninchen-Antiserum verwendet, das dann mit anti-Kaninchenkonjugat nachgewiesen wurde. Um unspezifische Reaktionen zu ermitteln lief bei jedem Test eine unbeschichtete Platte mit.

3.1.4. Reinigung von monoklonalen Antikörpern, Dotterantikörpern und Immunseren.

Bei der Prüfung von Mäuseasziten, Dotter-Antikörpern und Hyperimmunseren kamen in unbeschichteten Kontrollplatten immer unspezifische Reaktionen zur Beobachtung. Um die

unspezifische Reaktion im Test zu verringern bzw. auszu-
schalten, wurden die Antikörper gereinigt.

3.1.4.1. Kaolin-Behandlung

Nach der Inaktivierung bei 56°C für 30 Minuten wurden die
Immunseren mit Kaolin behandelt (Mayr et al., 1974). Dazu
wurde ein Teil Immunserum mit vier Teilen Kaolin (25 % in
0,85% NaCl-Lösung) gemischt, bei Zimmertemperatur 30
Minuten inkubiert und dabei ab und zu geschüttelt. An-
schließend wurde 30 Minuten bei 2000g zentrifugiert und
der Überstand gewonnen .

3.1.4.2. Protein-A-Affinitätschromatographie

Zur Abtrennung von IgG aus Mäuseasziten und Immunseren
wurde eine Affinitätschromatographie mit Protein-A-
Sepharose 4B (Pharmacia, Freiburg) durchgeführt. Die
Protein-A-Sepharose ließ man im Waschpuffer A (0,05M
Tris-HCl (pH 8,5) 0,15M NaCl und 0,002% Thimerosal) 10
Minuten quellen. Danach wurde sie mehrmals gewaschen und
in eine 5 ml-Säule gefüllt und mit dem sechsfachen
Säulen-Volumen Waschpuffer äquilibriert. Aszites wurde
vor der Verwendung zuerst in Eppendorfhütchen 10 Minuten
bei ca. 10.000g abzentrifugiert, der Überstand mit 0,1 ml
10fach konzentriertem Puffer A gemischt und auf die Säule
mit einer Flußrate von ca 0,5 ml/min. aufgetragen. Die
Protein A-Säule wurde mit ca. 6 Volumina Puffer A gewa-
schen, bis die Transmission wieder dem maximalen Aus-
gangswert entsprach. Dann wurde mit Puffer B (0,1M
Glycin-HCl, pH 3,0) eluiert. Die Fraktionen, die dem auf-
gezeichneten Peak entsprachen, wurden gepoolt und sofort
mit ca. 1 ml 10fach Puffer A auf pH 7,4 eingestellt. Aus-
gewählte Fraktionen wurden durch Ultrafiltration 10fach
konzentriert und im Elisa auf Coronavirusantikörper un-

tersucht. Der Proteingehalt der Eluate wurde nach Lowry et.al (1951) ermittelt.

3.1.4.3. Präzipitation des Globulins aus Immunseren

Zur Gewinnung des gesamten Globulins aus Seren diente die Ammoniumsulfatfällungsmethode. Verwendet wurde gesättigte Ammoniumsulfatlösung ($654\text{g } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 / 1\text{ H}_2\text{O}$). Zu 5 ml Immunserum wurde unter ständigem Rühren tropfenweise die gleiche Menge der Ammoniumsulfatlösung zugegeben und 30 Minuten gerührt. Anschließend wurde 30 Minuten bei 2.200g abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, das Sediment in 2 ml NaCl-PP aufgenommen und gegen NaCl-PP über Nacht dialysiert.

3.1.5.1. Herstellung von Peroxidase-Konjugaten

Zur Koppelung von Meerrettich-Peroxidase (PO) an BCV-Antikörper wurde die Zweischrittmethode mit Glutaraldehyd nach Avrameas und Ternynck (1971) durchgeführt. Verwendet wurden gereinigte monoklonale Antikörper aus Aszites (Proteingehalt ca. 6,5 mg/ml) und Globulin aus Kaninchen-Immunseren (Proteingehalt ca. 20 mg/ml). Bei der Konjugation von MAK wurden ca. 10 mg, beim Globulin ca. 50 mg eingesetzt, die Peroxidase-Menge war jeweils doppelt so hoch. Nach der Konjugation des Globulins wurden zusätzlich ungebundene und konjugierte Immunglobuline durch Gelchromatographie (Sephacryl S 300; Säulengröße 2,5 x 100 cm) getrennt. Ausgewählte Fraktionen wurden durch Ultrafiltration 10fach konzentriert.

3.1.5.2. Herstellung von Biotinkonjugaten

Zur Markierung von MAK mit Biotin wurde die von Peters et al. (1984) beschriebene Methode verwendet und z.T. modifiziert. Verwendet wurden über Protein A - Affinitätschromatographie gereinigte MAK. Der Proteingehalt der Lösungen wurde nach Messung der Absorption bei 260nm und 280nm nach der Formel "Proteingehalt (mg/ml) = $1,55 \times A_{280\text{nm}} - 0,77 \times A_{260\text{nm}}$ " bestimmt (Johnstone und Thorpe, 1982). Die MAK wurden dann mit Kopplungspuffer (0,1M

NaHCO_3 , pH 7,7) auf einen Proteingehalt von 1 mg/ml eingestellt und dann auf diesen Puffer umgesalzt. Dazu wurde Sephadex G50 coarse (Pharmacia, Freiburg) in diesem Puffer aufgenommen und nach Abgiessen der "fines" kurz gekocht. Das Gel wurde dann in eine 2 ml Plastikspritze ohne Stempel, deren Öffnung mit einem Glasfiterfilter bedeckt war, gegossen. Diese Minisäule wurde 10 min bei ca. 500g zentrifugiert. Bei Bedarf wurde nochmals Sephadex zugegeben und erneut zentrifugiert. Dann gab man 0,5 ml Kopplungspuffer mit 10% FKS zur Blockierung möglicher Proteinbindungsstellen auf die Säule und zentrifugierte wiederum. Anschließend wurden je Säule 0,2 ml MAK aufgetragen, zentrifugiert und die Eluate gepoolt. Nun wurde 1mg Biotin - epsilon - aminocaprinsäure - N - hydroxylsuccinimidester (Biotin - X - NHS; Sigma, München) in 1ml Dimethylformamid gelöst. Pro ml MAK - Lösung wurden 0,05 ml Biotin - X - NHS - Lösung zugegeben, gemischt und 30 min bei Raumtemperatur belassen. Um die Reaktion zu stoppen wurde umgesalzt auf 0,1M Natriumazetat, 0,2M NaCl (pH 5,0), ebenfalls mit der Minisäulentechnik. Schließlich wurden die Biotinkonjugate in NaCl - PP umgesalzt. Die Effizienz der Kopplung wurde überprüft durch Beschichtung von Elisaplatten mit einer Verdünnungsreihe der Konjugate im Doppelansatz. Zu einer Reihe gab man dann anti-Maus-Ig-Peroxidasekonjugat, zur anderen Avidin-Peroxidasekonjugat.

3.1.6. Coronavirus-Antigennachweis mit Elisa-Technik

Die bisher beschriebenen Elisa-Verfahren dienten zum Nachweis von Antikörpern gegen BCV. Ein Hauptziel dieser Arbeit sollte es jedoch auch sein, ein Testsystem zum Nachweis von BCV-Antigen zu entwickeln und als diagnostisches Verfahren zu etablieren. Erste Erfahrungen eigener und anderer Untersuchungen (Bachmann, 1985, pers. Mitteilung) ergaben jedoch eine Vielzahl von Schwierigkeiten, wobei unspezifische Reaktionen bzw. geringe Empfindlichkeit im Vordergrund standen. Deshalb wurden zur Entwick-

lung eines Coronavirus-Elisa unterschiedliche Antikörper (MAK, Kaninchenimmunserum, Meerschweinchenimmunserum, Dotterantikörper) verwendet. Beim Elisa benutzte Pufferlösungen, Waschschritte, Inkubationszeit, Substrat und Messungen waren wie vorne beschrieben. Als Indikator wurde anfangs, wie auch in den anderen beschriebenen Elisa-Verfahren OPD verwendet, später dagegen TMB (3',3',5',5'-Tetramethylbenzidin; Serva, Heidelberg), da bei OPD ein kanzerogenes Potential vermutet wird, während bei TMB ein solches nicht bekannt ist (Beards et al., 1984). Zur Verwendung von TMB als Indikator werden folgende Stammlösungen benötigt:

0,2M Natriumazetat

0,2M Zitronensäure

TMB: 100 mg gelöst in 10 ml DMSO (kann bei 4°C gelagert werden)

H₂O₂ (30%ig)

2M Schwefelsäure

Zur Durchführung werden 9,9 ml Natriumazetat und 0,1 ml Zitronensäure mit 10 ml a. dest und 0,2 ml TMB - Lösung gemischt. Kurz vor der Verwendung gibt man 24 µl H₂O₂ zu. Nach erneutem Mischen werden 0,1 ml in jede Vertiefung pipettiert. Nach 10 min wird die Reaktion durch Zugabe von 0,05 µl Schwefelsäure gestoppt. Dabei schlägt die Farbe des Indikators von blau nach gelb um, die Extinktion wird dann bei 450nm gemessen.

3.1.6.1. Elisa mit Immunseren

Es wurde zuerst ein Doppelsandwich-Elisa mit polyklonalen Antikörpern aus polyklonalen Immunseren versucht. Zur Plattenbeschichtung diente Meerschweinchen-Hyperimmunserum gegen BCV V270/83. Es wurde unbehandelt oder nach Behandlung mit Kaolin verwendet und 1:500 verdünnt. Zum Nachweis der gebundenen Testantigene wurde Kaninchenimmunserum bzw. Dotterantikörper verwendet, die dann mit

den entsprechenden anti-Spezies-Konjugaten nachgewiesen wurden.

3.1.6.2. Elisa mit monoklonalen Antikörpern und Immunseren

Aufgrund der erwähnten Schwierigkeiten bei der Entwicklung eines Elisa zum Nachweis von BCV-Antigenen mit polyklonalen Antikörpern wurden auch monoklonale Antikörper zur Plattenbeschichtung und als Nachweis-Antikörper verwendet. Zur Plattenbeschichtung wurden die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten MAK sowie ein weiterer, BCV-neutralisierender MAK (Klon I, Czerny, 1986) allein oder in unterschiedlichen Kombinationen verwendet. Dazu wurden sie 1:3000 in Karbonat/Bikarbonat-Puffer (pH 9,6) verdünnt. Als Nachweis-Antikörper dienten Meerschweinchen-Immunseren (1:1000 verdünnt), Kaninchen-Immunseren (1:5000 verdünnt) oder Dotter-Antikörper (1:20000 verdünnt). Diese Seren wurden dann mit den entsprechenden anti-Spezies Ig-Peroxidase Konjugaten nachgewiesen. Zum Nachweis der Bindung der Testantigene wurden zusätzlich mit Peroxidase markierte MAK und Globulin aus Kaninchen-Immunseren, sowie biotinylierte MAK verwendet.

3.1.6.3. Hemmtest (Blocking-Elisa)

Zur Überprüfung der Spezifität des BCV-Nachweises mittels Elisa wurden Hemmteste durchgeführt. Auf mit BCV-Antikörper beschichteten Platten wurden zunächst verschiedene Testantigene inkubiert; nach mehrmaligem Waschen wurden dann MAK oder polyklonale Antiseren zugegeben. Nach er-

neutem Waschen wurde mit Peroxidase-konjugiertes Kaninchenglobulin zugegeben und die Reaktion ausgewertet.

3.1.7. HA-Reaktion zum Nachweis von BCV-Antigen

Der Nachweis von BCV-Antigen in Kotproben und infizierten Zellkulturen durch HA mit Ratten- bzw. Mäuseerythrozyten erfolgte nach der von Lu (1985) beschriebenen Technik.

3.1.8. Testantigene

Um die Spezifität des BCV-Nachwieses im Elisa zu bestätigen wurden folgende Antigene verwendet: BCV München V270/83, Zellkulturüberstand, Sediment und Gradient, Humanes Coronavirus OC-43 (HCV OC-43, Vero-Zellkultur-Überstand und Gradient), Hämagglutinierendes Enzephalomyelitis Virus (HEV), Mäusehepatitisviren (MHV), TGE-Virus und, da ebenfalls häufig in Kotproben vorkommend, verschiedene bovine Rotavirusstämme.

3.1.9. Weitere Charakterisierung der Antikörper durch Immunoblotting

3.1.9.1. Elektrophoretische Auftrennung viraler Proteine

Für die Separierung der Proteine von BCV-Virionen wurde das diskontinuierliche denaturisierende Verfahren nach Laemmli (1970) gewählt. Die Auswahl der Materialien und Pufferlösungen erfolgte nach den Anleitungen von Hübert (1985) für die Elektrophorese von Antikörperproben. 50 µl der in Probenpuffer vorbereiteten gradientengereinigten Virussuspensionen wurden nach zweiminütigem Kochen in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Proteinkonzentration war auf 240 µg/ml eingestellt. Die Elektrophorese lief 16 Stunden bei 50 V und

ca. 25 mA. Die Acrylamidkonzentration des Trenngels betrug 10%.

3.1.9.2. Silberfärbung

Die aufgetrennten Proteinbanden wurden mit einer Silberfärbung, modifiziert nach Meßril et al. (1981), dargestellt. Die Herstellung der Färbe- und Fixierlösungen sowie Inkubationen und Waschschrirte folgten der Beschreibung von Krauss (1985) zur Anfärbung von Rotavirus-RNS in Laemmli-Gelen.

3.1.9.3. Immunoblotting

Die Antigenspezifität von AK in Kaninchenimmunseren und MAK wurde im Immunoblotting-Experiment untersucht. Dazu werden die aufgetrennten Viruspolypeptide auf einer Matrix (NC-Membran) fixiert und mit der zu untersuchenden AK-Probe inkubiert, dann die Matrix gewaschen und anschließend mit enzymgekoppelten anti-Spezies Immunglobulin überschichtet. Nach wiederholtem Waschen erfolgt die Sichtbarmachung einer stattgefundenen Ag-Ak-Reaktion mit einer Enzymsubstrat-Reaktion.

3.1.9.3.1. Transfer von viralen Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen.

Für den Transfer der aufgetrennten Virusproteine vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulose-Membran mit 0.45 µm Porengröße (Schleicher und Schüll, Bassel) diente das Western-Blotting-Verfahren nach Towbin et al. (1979).

Der Transfer erfolgte im elektrischen Feld in einer Transphor-Elektroblotkammer (LKB, München) mit dem von o.g. Autoren vorgeschlagenen methanolhaltigen Tris-Glycin-Puffer nach der im Transphor-Handbuch genannten Technik.

Die angelegte Spannung betrug 100 V bei 1-4 stündiger Elektrophoresedauer.

3.1.9.3.2. Nachweis der Bindung von polyklonalen
Immunseren und MAK an
immobilisierte BCV-Proteine.

Als Waschpuffer und Puffer für alle verwendeten Lösungen diente TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5). Alle Inkubationen und Waschschriffe fanden bei Zimmertemperatur auf einem Schüttler statt.

Freie Bindungskapazitäten der NC-Membran wurden nach dem Transfer zunächst mit 20% FKS in TBS geblockt. Nach zweimaligem Waschen (10 Min) in TBS mit Zusatz von 0,05% Tween 20 wurden die AK-Proben, suspendiert in TBS mit 0,05% Tween 20 und 5% FKS, aufgetragen. Kaninchenimmunsereu wurden 1:150 und MAK 1:50 verdünnt. Die Reaktionszeit betrug 120 Min bei Zimmertemperatur mit anschließender Stabilisierung über Nacht im Kühlschrank. Danach wurde dreimal 10 Min in TBS mit Tween gewaschen. Die Konjugate wurden 1:250 in TBS mit Tween und 5% FKS verdünnt und 90 Min inkubiert. Dann wurde zweimal 10 Min mit TBS mit Tween 20 und zweimal 10 Min mit TBS ohne Tween gewaschen. Für die Substratreaktion wurden zwei Stammlösungen vorbereitet.

Lösung A: 100 ml TBS + 60 µl 30% H_2O_2
(Endkonzentration 0,015%);

Lösung B: 20 ml Methanol, eiskalt, + 60 mg HRP-Color-Development-Reagent (Biorad, München). Die Lösung B wurde erst unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und sofort zusammen mit Lösung A auf die NC-Membran gegeben. Nach einer Reaktionszeit von maximal 20 Minuten wurde die Farbreaktion mit a.dest gestoppt und der fertige Blot zwischen Filterpapier getrocknet. Die Aufbewahrung gefärbter Blotts erfolgte lichtgeschützt bei 4°C.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Virusisolierung in Zellkultur

34 frisch entnommene oder tiefgefrorene Kotproben aus verschiedenen Beständen im Raum Süddeutschland wurden untersucht. In diesen Proben war mit dem EM bzw. der HA/HAH-Reaktion BCV nachgewiesen worden. Zur Virusisolierung wurden primäre bzw. sekundäre foetale bovine Hodenzellkulturen (FBH) einmal mit EMEM gewaschen und dann für 10 Minuten mit 5 µg/ml Trypsin behandelt. Nach der Beimpfung wurden die Zellkulturröhrchen in einem Rollerapparat inkubiert. Die Beurteilung des cpE war allerdings schwierig, da die Kontrollzellkultur durch die Trypsinbehandlung ebenfalls geschädigt war. Dennoch konnte bei zwei Kotproben eine Virusvermehrung mit der HA/HAH-Reaktion in der Isolierung und 1. Passage nachgewiesen werden. Die HA-Titer betrugen jeweils 1:16 bis 1:32. Um Degenerationerscheinungen der Zellkulturen zu verringern, aber dennoch BCV isolieren und vermehren zu können, wurde die Isolierungstechnik variiert. Zum Erhaltungsmedium wurde 1% FBS zugesetzt, die Trypsinkonzentration von 5 auf 1,25-2,5 µg/ml reduziert und die Einwirkungszeit auf drei bis fünf Minuten bei 37°C verkürzt. Diese Technik wurde an sieben Proben überprüft. Virusisolierung und Passage in Zellkulturen gelang wiederum nur bei zwei Kotproben, V246/86 und V312/86. Die Ergebnisse der HA Reaktion der Isolierungs- und Passageversuche mit sieben Kotproben sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Die in FBH-Kulturen gewonnenen BCV-Isolate wurden mit der IEM überprüft, und zeigten typische Coronaviruspartikel, die vom Immunserum komplexiert waren.

Tabelle 1: HA-Titer von mit Coronavirus positiven Kotproben infizierten Kälbenhoden-Zellkulturen

Passage	135/86	223/86	245/86	246/86	309/86	312/86	317/86
Isolierung	1:2	1:2	1:2	1:32	1:2	1:16	1:2
1	1:4	1:4	-	1:16	-	1:8	1:4
2	-	1:4	-	1:8	-	1:8	-
3	-	-	-	1:32	-	1:16	-
4	-	-	-	1:128	-	1:64	-
5	-	-	-	1:256	-	1:128	-

* - = < 1:2

3.2.2. Herstellung von Antiseren

3.2.2.1. Dotterantikörper

Alle immunisierten Hühner wiesen 15 Tage nach der dritten Reimmunisierung im Serum Antikörper gegen BCV auf. Die HAH-Titer schwankten zwischen 1:128 und 1:2048. Zur Beseitigung unspezifischer Reaktionen in diesem Test wurden die Seren mit Kaolin behandelt und anschließend mit Rattenerythrozyten adsorbiert. Vor der Verwendung im Neutralisationstest wurden die Seren zunächst mit Kaolin behandelt und dann an foetale Kälberlungenzellen (KL) adsorbiert. Durch die Behandlungen wurden unspezifische Reaktionen eliminiert. Im Neutralisationstest lagen die Titer zwischen 1:320 und 1:1280. Dabei gab es keine Korrelation zwischen den Titern im NT und der HAH. Wurden Dotter von Eiern, die ebenfalls nach der dritten Reimmunisierung gewonnen worden waren, mit Iso-propanol/Aceton aufgereinigt, erhielt man einen HAH-Titer von 1:256. Nennenswerte unspezifische Reaktionen wurden in der HAH nicht beobachtet. Eine weitere Aufreinigung der Dotterextrakten über Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Sephacal oder über Gelfiltration an Sephacryl S-300 brachte keine deutliche Verbesserung der Ergebnisse.

3.2.2.2. Kaninchen- und Meerschweinchenimmunsereen.

Zwei Kaninchen waren viermal (Tier I) bzw. fünfmal (Tier II) immunisiert worden. Dennoch wurde beim Tier II nur ein niedriger HAH-Titer von 1:128 erzielt. Der HAH-Titer im Serum von Tier I lag dagegen bei 1:4.000. Daher wurde nur das Serum des Tieres I verwendet. Im NT wurde ein Titer von 1:40.000, im Elisa gar von 1:51.200 erreicht. Dabei wurden kaum nennenswerte unspezifische Reaktionen beobachtet, außer im Elisa, da hier eine Bindung an unbeschichtete Platten bis zu einer Verdünnung von 1:8.000 festgestellt wurde. Zur Beseitigung dieser Reaktion wurden durch Ammoniumsulfat die Globuline ausgefällt und dialysiert. Dieses Material wurde weiter durch Affinitätschromatographie an Protein-A-Sepharose 4B gereinigt und durch Ultrafiltration wieder auf das Ausgangsvolumen eingeengt. Zusätzlich wurde das Serum mit Kaolin behandelt. Durch alle Behandlungsverfahren wurden unspezifische Bindungen reduziert, aber nicht völlig beseitigt. Die spezifische Reaktion wurde kaum beeinflusst. Die Reaktion dieses Serums mit unbeschichteten Platten lag sowohl unbehandelt als auch nach verschiedenen Behandlungsverfahren zwischen 1:1.600 und 1:4.000. Auf beschichteten Platten waren dagegen Reaktionen bis zu Verdünnungen von $1:0,5 \times 10^6$ und $1:2,6 \times 10^6$ nachweisbar. Tabelle 2 faßt die Ergebnisse der verschiedenen Reinigungsverfahren zusammen. Außerdem wurde im Elisa eine Bindung an nicht-infizierte KL-Zellproteine nachgewiesen. Diese Aktivität konnte durch Kaolinbehandlung deutlich reduziert, aber nicht vollständig beseitigt werden (Abbildung 1 und 2).

Tabelle 2: Vergleich verschiedener Methoden zur Beseitigung unspezifischer Bindungen von Kaninchen-Hyperimmunseren im Elisa

Behandlungsmethode	Elisa-Titer	
	BCV Platten	unbeschichtet
Protein-A Affinitätschromatographie	1:819200	1:4000
Ammoniumsulfat-fällung	1:2621440	1:2560
Kaolinbehandlung	1:819200	1:1600
Unbehandelt	1:512000	1:8000

3.2.3. Monoklonale Antikörper

3.2.3.1. Herstellung monoklonaler Antikörper gegen BCV V270/83

Balb/c Mäuse wurden mehrfach mit Gradienten-gereinigtem BCV V270/83 zusammen mit komplettem Freund'schen Adjuvans (CFA) immunisiert. Der Antikörperstatus einiger Tiere wurde im Elisa nach Blutentnahme aus dem retroorbitalen Venenplexus überprüft. Tiere mit hohen Antikörpertitern erhielten eine weitere i.v. bzw. i.p. Injektion mit Gradienten-gereinigtem BCV ohne Adjuvans und drei bis vier Tage später wurden die Milzzellen mit X63Ag8.653 Myelomzellen fusioniert. Eine Fusion wurde jeweils in 8 Mikrotiterplatten ausgesät. Bei einer Fusion waren nach 10 Tagen in 52 Vertiefungen der acht Platten (= 6,7%) eine oder mehrere Kolonien gewachsen. Die Kolonien wurden im Elisa auf Produktion von Antikörpern gegen BCV überprüft. Zur Reduzierung unspezifischer Bindungsaktivitäten im Medium wurde am Vortag das Zellkulturmedium nahezu vollständig entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Dann wurde jeweils 50µl Zellkulturüberstand auf BCV-beschichtete Platten und unbeschichtete Platten übertragen. In beiden Platten waren 50µl NaCl-PP mit

0,05% Tween vorgelegt worden. Als Kontrollen wurden Mäuseimmunserum und FKS benutzt. Kolonien, die auch in der Leerplatte reagierten, wurden nicht weiter beobachtet, während Kolonien, die in der Leerplatte keine Reaktion zeigten und in der BCV Platte Extinktionen über 0,1 aufwiesen, als positiv gewertet wurden.

Achtzehn Tage nach der Fusion wurden erneut Zellkultur-Überstände entnommen und titriert. Nun waren noch 22 Kolonien positiv. Sechs Kolonien mit den höchsten Elisa-Titern (Bezeichnung 4H12, 5A11, 3G12, 7F12, 4C10 und 1E11) wurden direkt aus der Mikrotiterplatte oder nach Vermehrung in 24-Loch-Platten mit der limiting-dilution Technik kloniert. Acht Tage nach der Klonierung wurden die Mikrotiterplatten unter dem Mikroskop kontrolliert. Vertiefungen, die nur eine Kolonie (=Klon) enthielten, wurden wie oben nach Mediumwechsel im Elisa auf Antikörperproduktion überprüft. Klone der Kolonien 4C10 und 1E11 waren nun durchweg negativ. Von den restlichen vier Kolonien waren in 131 von insgesamt 768 beschickten Vertiefungen der Mikroplatten einzelne Klone gewachsen. 92 davon (=70%) waren im Elisa positiv. Von jeder Ausgangskolonie wurden drei Klone mit den höchsten Extinktionswerten im Elisa ausgewählt und weiter vermehrt. Die Klone einer Ausgangskolonie verhielten sich, was die erreichten Titer im Elisa betrifft, praktisch identisch. Diese Titer lagen zwischen 1:64 und 1:2.048.

Um mögliche unspezifische Reaktionen auszuschalten, wurden serumfreie Zellkulturüberstände hergestellt und im Elisa untersucht. Bei den Klonen von 4H12 und 7F12 lagen die Titer von serumhaltigen und serumfreien Zellkultur-Überständen in der gleichen Größenordnung, bei den Klonen von 3G12 lag der Wert des serumfreien Überstands höher, bei den Klonen von 5A11 dagegen wesentlich niedriger. Zusätzlich wurden die MAK auf ihr Bindungsverhalten gegenüber nicht-infizierten KL-Zellen untersucht. In diese Untersuchungen wurde auch der im Rahmen einer früheren Arbeit (Czerny, 1986) hergestellte anti-BCV-MAK

Tabelle 3: Elisa-Titer von MAK und Kaninchen-
immunseren gegen Kälberlungen-Zellproteine

Klone bzw. Seren	Elisa-Titer	
	Serumfreier Überstand	Aszites
4H12/1F7	1:4	1:320
Clon 1	>1:2	1:5120
7F12/1G2	1:128	1:81920
5A11/1G8	1:256	1:327680
3G12/1B3	1:128	1:163840

Kaninchen- immunserum	Kaolinbehandelt 1:320	unbehandelt 1:10.240

Tabelle 4: Elisa-Titer von mit Protein-A gereinigten-
und unbehandelten Asziten

MAK	BCV-Platte	Kontrollplatte
5A11/1G8		
Prot-A behandelt	1:81.920	1:320
unbehandelt	1:512.000	1:16.000
4H12/1F7		
Prot-A behandelt	1:163.840	1:40
unbehandelt	1:256.000	1:1.000

Klon 1 einbezogen. Serumfreier Überstand dieses Klons reagierte hier völlig negativ, während bei den anderen getesteten MAK unterschiedlich starke Bindungsreaktionen beobachtet wurden (Tabelle 3, Abbildung 2). Zellkulturüberstände einiger Klone wurden außerdem im NT und der HAH untersucht. Klone von 3G12 und 7F12 reagierten in der HAH mit Titern zwischen 1:2 und 1:4 fraglich, alle anderen untersuchten Überstände reagierten in beiden Tests negativ.

Um größere Mengen MAK zu erhalten wurden jeweils 10^6 Zellen von acht Klonen in die Peritonealhöhle von mit Pristane vorbehandelten Mäusen injiziert. Die gewonnenen Aszites-Flüssigkeiten wurden nach zweimaliger Zentrifugation im Elisa untersucht. Dabei wurden hohe BCV-spezifische Antikörpertiter erzielt, aber auch auf unbeschichteten Platten wurden z.T. hohe Werte beobachtet (Tabelle 4).

3.2.3.2. Reinigung von MAK aus Aszitesflüssigkeit

Zur Reduzierung unspezifischer Bindungen von MAK in Aszitesflüssigkeiten wurden diese über Protein A-Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Einengen auf ca. das Ausgangsvolumen wurden ungereinigte und gereinigte Proben im Parallelansatz auf BCV-beschichteten und unbeschichteten Platten untersucht. Gereinigte MAK wiesen eine 25-40fach verminderte unspezifische Reaktivität auf, während die spezifische Reaktionen nur um den Faktor 2-6 verringert wurden (Tabelle 4; Abbildung 3).

3.2.3.3. Bestimmung der Immunglobulinklassen bzw. -subklassen der MAK

Zur Bestimmung der Isotypen der MAK wurden serumfreie Zellkulturüberstände in einer Verdünnung von 1:2 auf Elisaplatten beschichtet. Anti-Isotyp-Seren wurden dann ausgehend von 1:100 verdünnt. Zur Auswertung zeigte sich eine Verdünnung von 1:400 als optimal. Als positiv wurde das Antiserum gewertet, das bei dieser Verdünnung eine Extinktion von mehr als 1 erzielte. Außerdem mußte die

Extinktion mindestens 0,4 über den Werten der anderen Antisera liegen. Unter Anwendung dieser Kriterien konnten Klone der Ausgangskolonien 7H12 und 4H12 eindeutig als IgG₁ klassifiziert werden. Zur Klassifizierung von Klonen der Kolonien 5A11 und 3G12 wurden dagegen eines der Kriterien nur teilweise erfüllt, da bei den Extinktionswerten der Abstand von 0,4 nicht immer erreicht wurde. Dennoch sind mit hoher Wahrscheinlichkeit Klone von 5A11 IgG₃ und Klone von 3G12 IgG₁. Die Extinktionswerte der einzelnen Klone sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

3.2.3.4. Kompetitions-Elisa

Um abzuklären, ob die MAK unterschiedliche Epitope von BCV erkennen, wurde ein Kompetitions-Elisa mit den biotinylierten MAK 4H12/1F7 und Klon 1 sowie dem Peroxidase-markierten MAK 5A11/1G8 durchgeführt. Dabei kam es bei homologen Reaktionen zur deutlichen Hemmung; auch andere Klone, die von derselben Ausgangskolonie abstammen, wurden gehemmt. In allen heterologen Ansätzen kam es jedoch zu keiner Hemmung der Bindung der MAK-Konjugate (Tabelle 6).

3.2.3.5. Weitere Charakterisierung der MAK durch Immunoblotting

Nach Auftrennung gereinigter BCV-Virionen in der SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung waren regelmäßig

Abbildung 1: Extinktionswerte von kaolinbehandeltem, Protein-A-gereinigtem und unbehandeltem Kaninchenimmenserum gegen BGV-Zellkulturmaterial

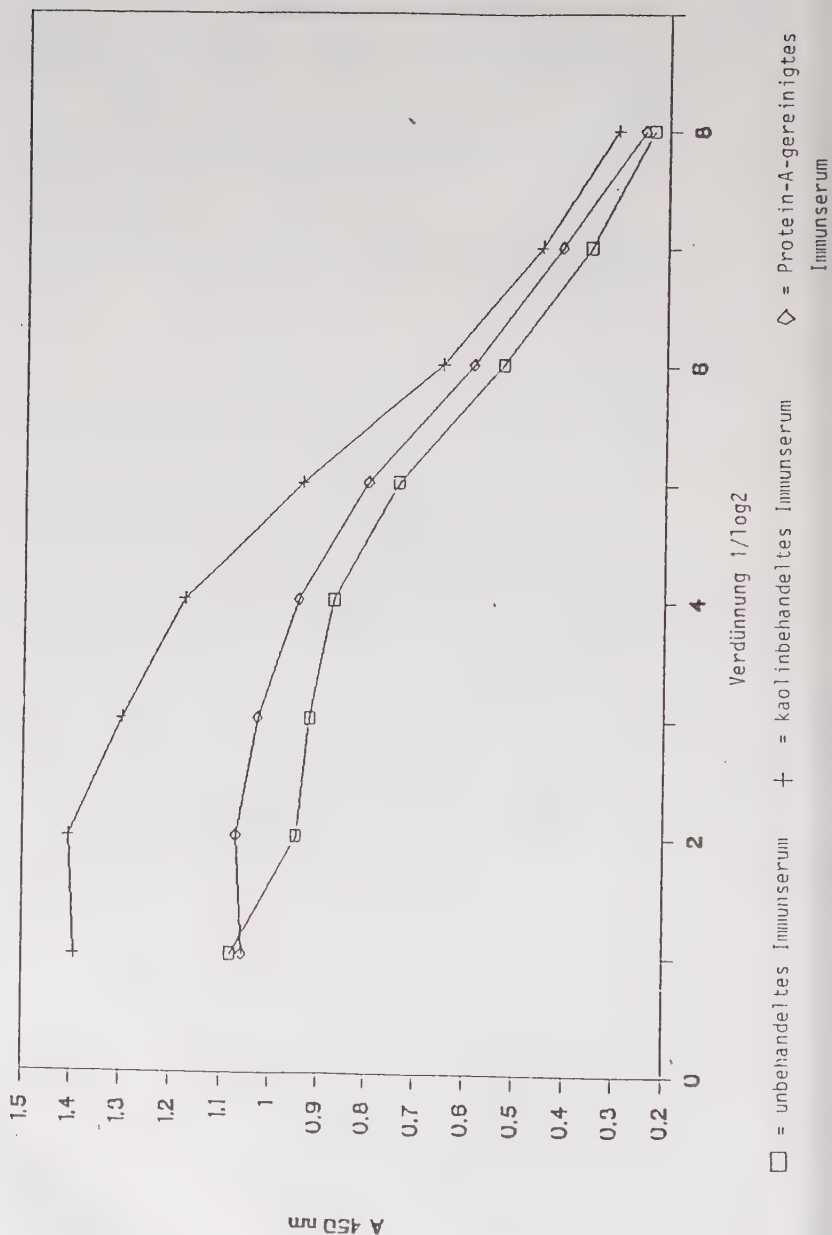


Tabelle 5: Elisa-Extinktionswerte von MAK in serumfreiem Medium (1:2) bei der Untersuchung mit anti- Isotyp-Seren

Klon	Anti-Isotyp-Serum(1:400 verdünnt)					
	IgA	IgM	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG3
7F12/1G2	0.217	0.183	1.062	0.120	0.326	0.126
5A11/1G8	0.122	0.087	0.695	0.159	0.324	1.036
5A11/2F5	0.157	0.111	0.746	0.170	0.340	1.075
5A11/1E5	0.193	0.125	0.873	0.226	0.635	1.251
4H12/1F7	0.067	0.117	1.137	0.006	0.376	0.173
4H12/1B7	0.104	0.160	1.237	0.030	0.507	0.265
4H12/1D4	0.086	0.134	1.297	-	0.526	0.198
3G12/1F8	0.322	0.123	1.814	1.432	0.532	0.686
3G12/2F1	0.283	0.106	1.862	1.371	0.597	0.617
3G12/1B3	0.266	0.139	1.825	1.259	0.490	0.599

Tabelle 6: Ergebnisse der Konkurrenz-Elisa mit MAK

MAK	<u>Verwendete Konjugate</u>		
	4H12 Biotin.	BCV1/1 Biotin.	5A11 POD
BCV 1/1	-	+	-
BCV 1/2	-	+	-
4H12/1D4	+	-	-
4H12/1F7	+	-	-
4H12/1B7	+	-	-
3G12/1B3	-	-	-
3G12/2F1	-	-	-
3G12/1G8	-	-	-
7F12/1G2	-	-	+
5A11/1G8	-	-	+
5A11/2F5	-	-	NT
5A11/1E5	-	-	NT

* + = Hemmung (= >50% Reduktion der A_{450nm})

- = keine Hemmung

NT = Test nicht durchgeführt

Proteine mit ca. 120KD, 100KD, 52KD und 26KD sichtbar. Nach Blotten der Gele auf NC-Membranen und Immunfärbung mit Kaninchenimmenserum wurden diese Strukturen ebenfalls sichtbar. Dagegen konnten weder MAK 4H12 noch Klon 1 an aufgetrennte virale Proteine binden.

3.2.4 Versuche zur Etablierung eines Elisa zum Nachweis von BCV-Antigen.

3.2.4.1. Versuche mit polyklonalen Antiseren

Die Einrichtung eines Elisa zum Nachweis von BCV-Antigen wurde mit verschiedenen Kombinationen von Immunsereen und Dotterantikörpern versucht. Keines der verwendeten Verfahren war jedoch befriedigend, weder im Hinblick auf Spezifität noch auf Empfindlichkeit.

3.2.5. Versuche mit monoklonalen Antikörpern

Auch hier wurde eine Reihe von Kombinationen versucht, die in Tabelle 7 zusammengefaßt sind.

3.2.5.1. Plattenbeschichtung

Vorversuche zum Einsatz von MAK zeigten, daß sie sich besonders gut als Fangantikörper zur Plattenbeschichtung eigneten. Zur Ermittlung des optimalen MAK bzw. einer Kombination wurden MAK einzeln oder in verschiedenen

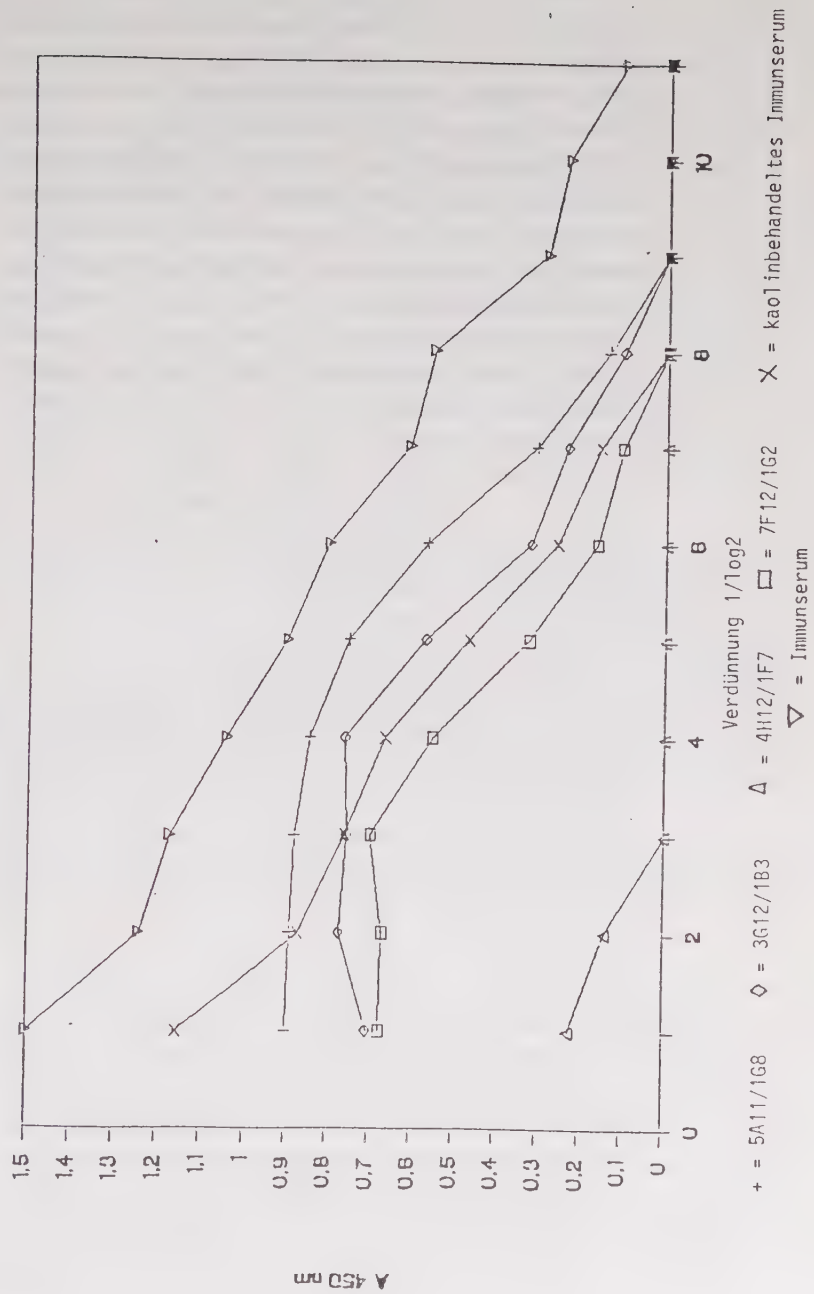
Tabelle 7: Elisa-Testanordnungen zum Nachweis von BCV mit MAK und polyklonalen Antikörpern

Plattenbeschichtung	Nachweissystem	
	Nachweisantikörper	Substrat
1. 4H12, SF 1:2	Kaninchenimmuns- serum 1:10000	OPD
2. 4H12+5A11+3G12+7F12, SF 1:2	-"	OPD
3. 4H12+5A11+7F1+3G12, SF 1:2	-"	OPD
4. --- " ---	Meerschweinchen- immunserum, 1:1000	OPD
5. 4H12+Klon1, SF 1:2	Dotterantikörper 1:10000	OPD
6. 4H12, SF 1:2	-"	OPD
7. 4H12+5A11+3G12+7F12, SF 1:2	-"	OPD
8. 4H12+Klon1, Asz. 1:3000	Kaninchenimmun- serum, kaolin- behandelt 1:2000	OPD
9. 4H12+Klon1, Asz. 1:5000	-"	TMB
10. 4H12+Klon1, Asz. 1:5000	Kaninchenimmun- serum-PO-konjugat	TMB
11. ---"---	4H12+Klon1, 1:200 bzw. 1:2000	TMB

* Der Nachweis der Bindung von Nachweisantikörpern erfolgte mit dem jeweiligen anti-spezies-Ig-Konjugat, bei biotinylierten MAK mit Avidin-Peroxidase.

SF = serumfreier Zellkulturüberstand

Abbildung 2: Elisa-Titer von MAK und Immunsereen gegen Kälberlungen-Zellproteine



Variationen gemischt auf Platten beschichtet. Nach der Titration von verschiedenen BCV-Präparationen (Zellkulturüberstand, Sediment, Gradient) sowie einer HAH-positiven Kotprobe, Rotavirus und nicht-infizierten KL-Zellen wurde BCV-Antigen mit kaolinbehandeltem Kaninchenimmenserum oder anderen polyklonalen Antikörpern nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine Kombination der MAK 4H12 und Klon 1 als optimal (Abbildung 4). Für die Verwendung von Aszites zur Plattenbeschichtung wurde eine Gebrauchsverdünnung in einem Schachbrettversuch mit 1:5.000 festgestellt. Auf solchen Platten wurden bis zu 8fach höhere BCV-Antigen-Titer als bei anderen Plattenbeschichtungen erzielt. Rotavirus und KL-Zellproteine reagierten negativ.

3.2.5.2. Nachweis-Antikörper

Sowohl polyklonale Seren als auch MAK wurden auf ihre Eignung als Nachweisantikörper untersucht.

3.2.5.2.1. Dotterantikörper

Zunächst wurde eine Gebrauchsverdünnung für Dotterantikörper mit 1:10.000 bestimmt. Mit BCV-Sediment bzw. Gradient wurden Extinktionen von 0,8 erreicht. Allerdings reagierte auch die mitgeführte Rotavirusprobe leicht positiv. Eine höhere Verdünnung der Dotterantikörper führte zu einer drastischen Reduktion der Extinktionen von BCV-Proben.

3.2.5.2.2. Meerschweinchenimmenserum

Für dieses Serum wurde die Gebrauchsverdünnung mit 1:1000 bestimmt und dann verschiedene BCV-positive und -negative Proben getestet. Das Serum reagierte sehr gut mit BCV-positiven Proben und nicht mit anderen Proben, allerdings wies der Test im Vergleich zu anderen Kombinationen einen hohen Hintergrund auf. Eine höhere Gebrauchsverdünnung reduzierte die Empfindlichkeit des BCV-Nachweises drastisch.

3.2.5.2.3. Kaninchenimmunseren

Wegen der starken Reaktion des unbehandelten Kaninchenimmunserums gegen KL-Zellproteine wurde das Serum mit Kaolin behandelt bzw. über Protein A gereinigt und dann nach Ermittlung der optimalen Verdünnung (1:2.000) als Nachweisantikörper eingesetzt. Dabei erwies sich kaolinbehandeltes Immunserum dem Protein A-gereinigtem und dem unbehandeltem Immunserum sowie allen anderen polyklonalen Antiseren als weit Überlegen. Die mit kaolinbehandelten Immunseren erzielten Extinktionen lagen bis zu 0,8 über den Werten des unbehandelten oder Protein A gereinigten Immunserums (Abbildung 1). Unter Zugrundelegung des gleichen Grenzwerts wurde bei einer HAH-positiven Kotprobe mit kaolinbehandeltem Immunserum ein 8fach höher BCV-Antigentiter erzielt.

3.2.5.2.4. Kaninchenimmunserum-Peroxidasekonjugat

Für die Verwendung von Peroxidase-Konjugation Immunserum war zunächst im Sachbrettversuch eine Gebrauchsverdünnung von 1:2000 festgestellt worden. Bei Titration verschiedener BCV-positiver Proben wurden in niedrigen Konzentrationen hohe Extinktionen erzielt, aber die Werte fielen rasch ab, so daß wesentlich niedrigere Titer als im indirekten Elisa mit Kaninchenserum erzielt wurden (Tabelle 8). Eine niedrigere Verdünnung des Konjugats führte dagegen zu Hintergrundreaktionen.

3.2.5.2.5. Biotinylierte MAK

Die MAK 4H12 und Klon 1 wurden mit Biotin-X-NHS konjugiert. Die Kopplung war für Klon 1 wesentlich effizienter, er konnte 1:2.000, MAK 4H12 nur 1:200 verdünnt werden konnte. Allerdings reagierte dieser MAK auch mit anti-Maus-Ig-Konjugat wesentlich schwächer. Auf 4H12/Klon 1 Platten wurden dann BCV-Zellkulturüberstand, je eine HAH-positive und -negative Kotprobe sowie Rotavirus verdünnt. Beide MAK (gemischt in den o.g. Verdünnungen) reagierten nicht mit den BCV-negativen

Tabelle 8: Vergleich des BCV-Nachweis in Kotproben im Elisa mit biotinylierten MAK, Kaninchen-immunserumkonjugat und Kaninchenimmunserum mit anti-Rabbitkonjugat

Probe-Nr	MAK	Kan. PO-Konjugat	Kan.-IS
391	>1:80	>1:80	>1:80
436	-	-	1:40
355	>1:80	>1:80	>1:80
490	-	-	1:80
471	-	-	1:80
341	-	1:20	1:80
451	>1:80	1:80	>1:80
392	-	-	1:80
486	>1:80	>1:80	1:80
367	-	-	1:40
354	-	-	1:40
442	-	-	1:40
434	-	>1:80	>1:80
408	>1:80	>1:80	>1:80
401	-	>1:80	>1:80
390	-	-	>1:80
346	-	-	-

Proben, die Empfindlichkeit des BCV-Antigennachweises war jedoch geringer als mit kaolingereinigtem Kaninchenimmuns-
serum. Diese niedrigere Empfindlichkeit der biotinylierten
MAK wurde auch in einem Vergleich der Reaktionen von
17 HAH-positiven Kotproben deutlich, die auf identischen
4H12/Klon 1 Platten verdünnt worden waren und dann mit
biotinylierten MAK, Kaninchenimmuns-
serum-Peroxidase-
konjugat bzw. mit Kaninchenimmuns-
serum und anti-Kaninchen-
Ig-Konjugat behandelt wurden. Dabei reagierten 16 Proben
im indirekten Elisa positiv, 8 Proben im Elisa mit poly-
klonalem Konjugat, die biotinylierten MAK erkannten aber
BCV-Antigen nur in 5 Proben (Tabelle 8). Dabei erkannten
beide Konjugate nur Proben mit hohem BCV-Titer ($>1:80$,
beim polyklonalen Konjugat einmal $1:20$), die auch im in-
direkten Verfahren einen solchen Titer aufwiesen. Proben,
deren BCV-Antigentiter in diesem Test bei $1:40$ bis $1:80$
lagen, wurden von den anderen Verfahren als negativ ge-
wertet. Eine Kotprobe war in allen drei Tests negativ.
Aufgrund dieser Ergebnisse wurden für alle weiteren
Untersuchungen zum Nachweis von BCV-Antigen mit
4H12/Klon 1 beschichtete Platten sowie kaolinbehandeltes
Kaninchenimmuns-
serum als erster Antikörper und anti-
Kaninchen-Ig-PO-Konjugat als zweiter Antikörper verwen-
det. Als Grenzwert zur Titerbestimmung wurde $0,15$ festge-
setzt.

3.2.5.3. Nachweis der Spezifität des BCV-Nachweises im Elisa durch einen Hemmtest.

Dieser Test wurde mit MAK und Immuns-
serum durchgeführt. Einmal wurden BCV-Zellkulturantigen bzw. eine positive
Kotprobe mit Meerschweinchenimmuns-
serum bzw. Dotteranti-
körpern in unbeschichteten Mikrotiterplatten inkubiert
und dann auf MAK 4H12/Klon 1-Platten übertragen. Der BCV-
Nachweis erfolgte wiederum mit kaolinbehandeltem
Kaninchenimmuns-
serum. Beide Antiseren führten zu einer
Hemmung der Bindung des Kaninchenimmuns-
serums. Zusätzlich
wurden BCV-Antigene mit dem MAK 4H12 und Klon 1 sowie mit
Kaninchenimmuns-
serum inkubiert. Nach Übertragen auf be-

schichtete Platten wurde BCV-Antigen mit den biotinylierten MAK 4H12 bzw. Klon 1 nachgewiesen. Hier kam es zu einer vollständigen Hemmung der Reaktion, wenn die homologen MAK verwendet wurden. Gegenseitig hemmten sich die MAK dagegen nicht. Auch das Kaninchenimmenserum konnte die Bindung der biotinylierten MAK nicht blockieren.

Tabelle 9: Elisa- und HA - Titer von verschiedenen zellkulturadaptierten Coronavirusstämmen

Virusstämme	Elisa-Titer	HA-Titer
BCV 800 (Holland)	512	128
BCV 410/83 München	128	32
BCV 270/83 München	1024	256
BCV 393/83 München	512	64
Corona P1239 (Frankreich)	512	64
BCV 312/86 München	256	32
BCV 246/86 München	128	32
RIT-Genval BCV (Belgien)	256	32

HCV OC-43	1024	256
HEV	4	NT
NHV	-	NT
MHV 1	-	NT
MHV 3	-	NT
TGE	-	NT

* NT = nicht getestet

3.2.6. Sensitivität des BCV-Elisa im Vergleich zur HA/HAH und zum EM.

Zur Abschätzung der Empfindlichkeit des BCV-Elisa wurden zunächst Zellkultur-adaptierte BCV-Stämme verschiedener Herkunft in der HA sowie im BCV-Elisa getestet. In der HA wurden Titer von 1:32 bis 1:256 erzielt, im Elisa von 1:128 bis 1:1024. Bei allen Proben waren die Elisa-Titer vier- bis achtmal höher als die HA-Titer (Tabelle 9). In Abbildung 5 sind außerdem die Titrationskurven einiger boviner Coronavirusisolate dargestellt. Diese BCV-Stämme verhalten sich hier nahezu identisch, mit dem Elisa lassen sich also innerhalb der bovinen Coronaviren keine antigenetischen Unterschiede feststellen.

Außerdem wurden insgesamt 443 Kotproben untersucht. Diese Proben waren nach Aufbereitung in der HA/HAH untersucht und dann bei 70°C aufbewahrt worden. Dabei waren nach Bachmann (1982, unveröffentlicht) Proben mit einem HA-Titer unter 1:100 negativ gewertet worden, während Proben mit HA-Titern von 1:200 und höher in der HAH überprüft worden waren. 234 der 443 untersuchten Proben besaßen HA-Titer unter 1:100, doch bei 37 dieser Proben (=15,8%) wurde im Elisa eine positive Reaktion festgestellt. Von 114 Proben, die HA-Titer von >1:200 aufwiesen, aber in der HAH mit anti-Coronavirusimmunserum negativ waren, reagierten 39 (=34,2%) im Elisa positiv. Dagegen waren von 95 HAH-positiven Kotproben 68(=71,6%) auch im BCV-Elisa positiv (Tabelle 10).

Tabelle 11 gibt einen Überblick über die Übereinstimmung beider Nachweisverfahren. Sie ist relativ hoch bei der Beurteilung deutlich negativer bzw. positiver Proben (84,2% und 71,6%). Niedriger liegt der Prozentsatz bei HA-positiven Proben, die aber HAH-negativ gewertet worden waren (65,8%).

Zusätzlich wurden einige Proben im EM untersucht. Vier Proben mit mittleren (Extinktion ca. 0,5) bzw. hohen (Extinktion >1) Elisa-Werten wurden im EM mit + (wenige Partikel) bis +++ (sehr viele Partikel) gewertet. Dagegen

gelang der elektronenoptische Nachweis in Kotproben mit niedrigen Extinktionswerten (0,1-0,25) nicht.

3.2.7. Reaktivität von Coronaviren anderer Spezies im BCV-Elisa.

Einige Coronaviren anderer Spezies wurden im Elisa untersucht, um abzuklären, ob sich dieses Verfahren zu einer besseren serologischen Klassifizierung von Coronaviren eignet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Dabei reagierte HCV-OC43 ebenso wie bovine Coronaviren (Antigentiter 1:1024), während HEV nur schwach reagierte (Antigentiter 1:4) und TGEV sowie Mäusehepatitisviren negativ waren. Auch der Verlauf der Titrationskurve von HCV OC-43 ist den BCV-Stämmen sehr ähnlich, was auf eine nahe Antigenverwandtschaft dieser Stämme schließen läßt.

Tabelle 10: Vergleichende Untersuchungen
von Kotproben mit der HA/HAH und im Elisa

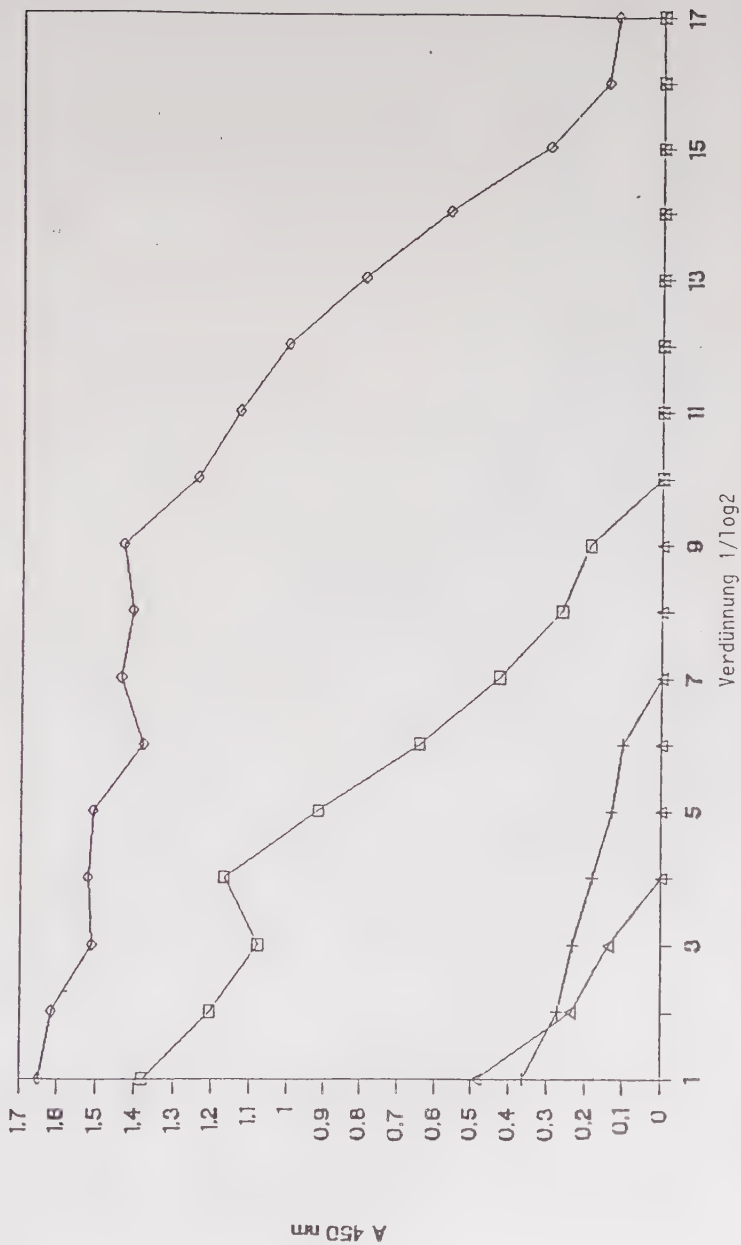
	HA-Titer	HAH	Elisa-positiv	%
Probenzahl				
234	<1:100	-	37	15.8%
114	>1:200	-	39	34%
95	>1:200	+	68	71.6%

Tabelle 11: Übereinstimmung zwischen HAH und Elisa

Beurteilung	HA-Titer	HAH	Elisa	%
neg + neg	<1:100	234	197	84.2%
neg + neg	>1:200	114	75	65.8%
pos + pos	>1:200	95	68	71.6%

Abbildung 3: Extinktionswerte der Protein-A-Eluate von Asziten der Klonen 5A11/1G8

und 4H12/1F7 auf der BCV- und Leerplatten



□ = 5A11/1G8 auf der BCV-Platten

+ = 5A11/1G8 auf der Leerplatten

◇ = 4H12/1F7 auf der BCV-Platten

Δ = 4H12/1F7 auf der Leerplatten

Abbildung 4: Einfluß der Plattenbeschichtung mit verschiedenen MAK auf die Elisa-

Titer von BCV 270

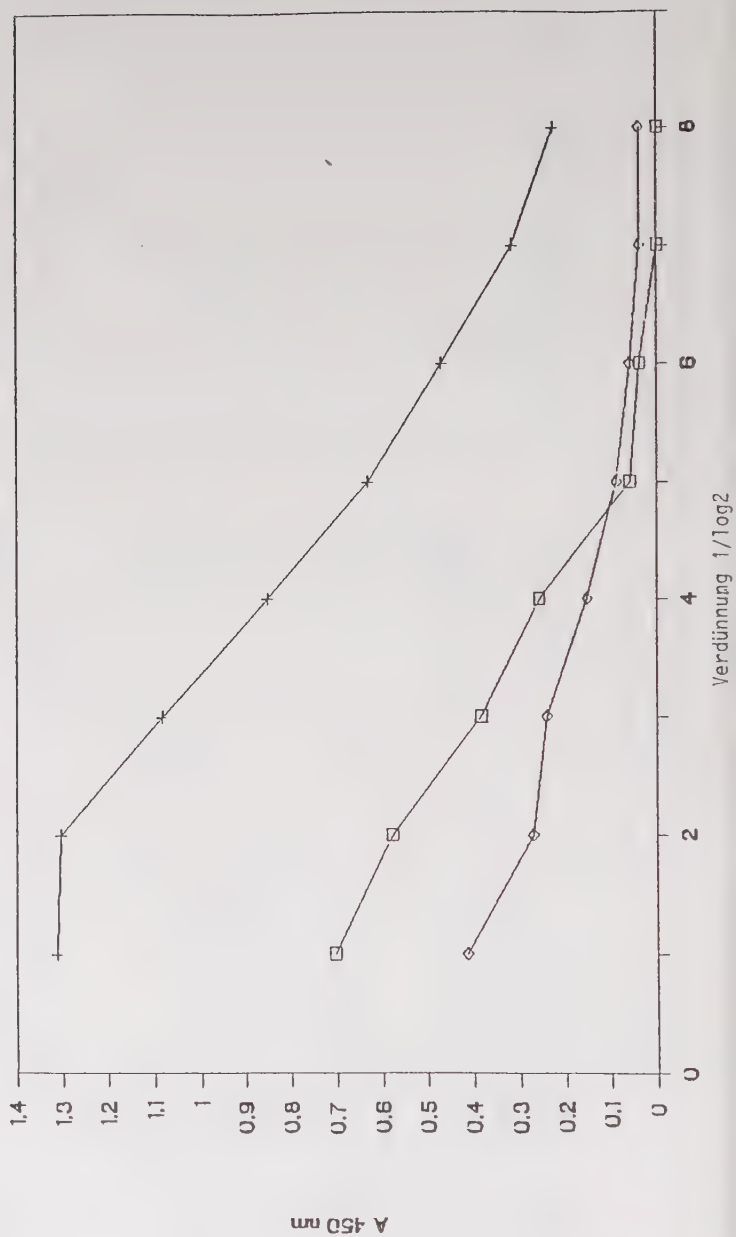
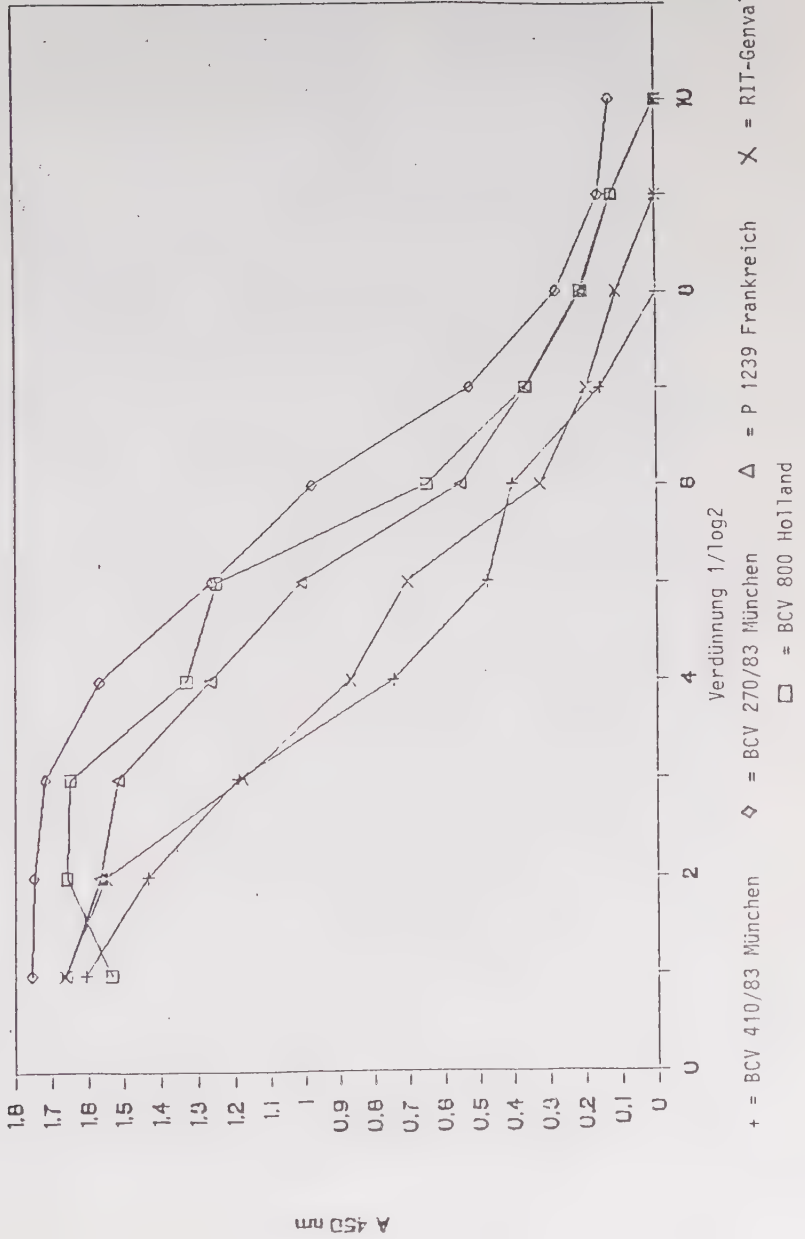


Abbildung 5: Extinktionswerte von verschiedenen bovinen Coronavirusstämmen



4. Besprechung der Ergebnisse

Zunächst wurde versucht, die Diagnose von BCV aus dem Kot durch Virusisolierung in FBH-Zellkulturen zu optimieren. Dazu wurden die von Lu (1985) sowie Czerny (1986) beschriebenen Techniken verwendet, die eingesetzten Mengen an Trypsin sowie die Einwirkungszeiten jedoch variiert. Dennoch gelang die Anzüchtung von BCV nur aus 4 von 41 untersuchten HAH-positiven Proben. Diese 4 Isolate stammen von frisch entnommenen Proben, während ein Großteil der restlichen Proben tiefgekühlt (z.T. 20°C, z.T. 70°C) vor Versuchsbeginn gelagert worden war. Daraus kann geschlossen werden, daß die Infektiosität boviner Coronaviren im Kot auch bei kurzzeitiger Lagerung bei 70°C rasch vernichtet wird. Ähnliche Beobachtungen machte auch Lu (1985). Die problemlose Anzüchtung von BCV in bovinen Zellkulturen, wie sie von Fenner et al. (1987) geschildert wird, bezieht sich möglicherweise auf frisch entnommene Kotproben. Der routinemäßige Nachweis von BCV durch Hämadsorption an beimpften Zellkulturen gelang in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht.

Die Herstellung spezifischer Immunsereen gegen BCV in Meerschweinchen und Kaninchen sowie die Anreicherung von Antikörpern aus dem Dotter immunisierter Hühner war problemlos, wenn man die relativ hohen HAH- sowie NT-Titer betrachtet. Dagegen war die Etablierung eines Elisa zum BCV-Antigennachweis mit Schwierigkeiten verbunden, da es zu unspezifischen Bindungen auf unbeschichteten bzw. mit anderen Antigenen beschichteten Platten kam. Zur Reduzierung dieser Aktivitäten wurden einige Verfahren verwendet, aber nur die Kaolinbehandlung des Kaninchenserums war zufriedenstellend. Ausfällen des Globulins oder Reinigung über Protein A brachte dagegen keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Daher gelang es nicht, einen BCV-Antigen-Elisa nur mit polyklonalen Immunsereen zu etablieren, wie es von Ellens et al. (1978) und Reynolds et al. (1984) beschrieben worden war. Dies deckt sich mit der Beobachtung von Crouch et al. (1984), die ebenfalls aufgrund unspezifischer Reaktionen nicht in der Lage waren,

einen solchen polyklonalen Elisa zu entwickeln.

Für die mangelnde Spezifität solcher Nachweisverfahren könnten Kreuzreaktionen mit Antigenen nicht BCV-infizierter boviner Zellen verantwortlich sein, die in den polyklonalen Immunseren mit hohen Titern nachgewiesen wurden. Diese Reaktionen konnten, zumindest beim Kaninchenimmunserum, durch Kaolinbehandlung zwar reduziert, aber nicht vollständig beseitigt werden. Wenn jedoch sowohl Fang- als auch Nachweisantikörper über solche, nicht BCV-spezifische, Aktivitäten verfügen, sind unspezifische, falsch-positive Reaktionen leicht erklärbar. Zudem war bei Dotterantikörpern eine Reaktion mit Zellkultur-adaptiertem Rotavirus nachweisbar. Da diese Viren in einer Affennierenzelllinie (Ma 104) vermehrt worden waren, ist eine Reaktivität gegen Zellproteine eher unwahrscheinlich. Vielmehr liegt die Vermutung nahe, daß die verwendeten Hühner entweder bereits vor Versuchsbeginn mit Rotaviren infiziert waren oder daß während der Immunisierung eine subklinische Rotavirusinfektion stattfand. Zur Beseitigung solcher nicht erwünschten Antikörperaktivitäten ist die Reinigung von Immunseren über Affinitätschromatographie mit gereinigten BCV-Virionen bzw. Proteinen sehr gut geeignet. Diese Technik wurde auch von Sato et al. (1984) zur Reinigung von Antiseren, die dann in der RPHA verwendet wurden, eingesetzt. Obwohl dieses Verfahren sehr elegant ist, besitzt es auch Nachteile, da hochgereinigtes Virus in größeren Mengen benötigt wird. Ein weiterer Grund für das Auftreten unspezifischer Reaktionen sowie für die hohe Hintergrundreaktion sind wohl Kreuzreaktionen der anti-Spezies-Ig-Antikörper bzw. -Konjugate. Die Kreuzreaktivität wirkt sich besonders bei BCV-negativen oder nur schwach-positiven Proben aus, da hier die Fangantikörper für die sekundären Antikörper voll verfügbar sind. Solche Aktivitäten sind möglicherweise die Ursache für die relativ hohen Hintergrundwerte, die bei der Verwendung von Meerschweinchenimmunserum als Nachweisantikörper beobachtet wurden. Eine Elimination dieser Kreuzreaktion durch vorherige Absorption mit dem Immunserum, das als Fangantikörper diente, wurde nicht

versucht, da die Effektivität dieses Vorgehens bei jeder neuen Charge des sekundären Antikörpers (bzw. -Konjugat) neu ausgetestet werden müßte. Um die Spezifitätsprobleme auf andere Art zu lösen, wurde versucht monoklonale Antikörper herzustellen. Nach mehrmaliger Immunisierung mit gereinigtem BCV besaßen Balb/c-Mäuse hohe Antikörpertiter im Serum. Die Effizienz der Fusion von Milzzellen immunisierter Mäuse mit Myelomzellen war jedoch gering. Nur bei einer von mehreren Fusionen waren in 6,7% der beschickten Vertiefungen Kolonien gewachsen. Fazekas de St. Groth und Scheidegger (1980) berichten über eine wesentlich höhere Erfolgsrate bei der Fusion muriner Zellen.

Die Ursachen für dieses schlechte Fusionsergebnis sind nicht klar ersichtlich, da die Instruktionen dieser Autoren genau befolgt wurden. Möglicherweise ist jedoch die verwendete Population (=Substamm?) von Balb/c-Mäusen von Bedeutung. Nach Czerny (1987, pers. Mitteilung) stieg die Fusionsrate nach Verwendung von Balb/c-Mäusen, die aus einer anderen Zucht stammten, im Vergleich zu Mäusen aus der in dieser Arbeit verwendeten Population, stark an. Die im Rahmen dieser Arbeit hergestellten MAK wurden streng darauf selektioniert, daß keine Bindung an unbeschichtete Platten erfolgte. Wurde jedoch von diesen MAK Aszites hergestellt, so kam es zu starken Aktivitäten gegen solche Platten ("sticky antibodies"). Auch durch Reinigung über Protein A konnten diese Bindungen nicht vollständig beseitigt werden. Solche "sticky"- Aktivitäten werden jedoch auch im Aszites nicht immunisierter Mäuse nachgewiesen. Daraufhin wurden die MAK auch auf ihre Reaktion gegen Antigene nicht infizierter boviner Zellen untersucht und dabei niedrige bis hohe Werte erzielt, obwohl zur Immunisierung ja hochgereinigtes Virus verwendet worden war. Für diese Beobachtung gibt es einige mögliche Erklärungen:

1. Es gibt Kreuzreaktionen zwischen BCV-Antigenen und Antigenen nicht infizierter Rinderzellen. Hierfür spricht der, zumindest beim MAK 4H12, unterschiedliche Titrationskurvenverlauf auf BCV- und KL-Platten.
2. Das verwendete Reinigungsverfahren ist nicht effizient

genug, um alle nicht-viralen Proteine abzutrennen. Da die MAK mit den auf dieselbe Weise gereinigten Präparationen getestet werden, könnten solche Aktivitäten selbst bei Abwesenheit von "sticky" Reaktionen übersehen werden. Dieser Erklärungsversuch erscheint für die anderen hergestellten MAK (außer 4H12) wahrscheinlicher, da diese MAK zwar an BCV-Antigen binden, aber über keine weiteren biologischen Aktivitäten verfügen.

Dagegen besitzt der ebenfalls zur Etablierung des Elisa verwendete MAK Klon 1 (Czerny, 1986) eine hohe neutralisierende Aktivität, aber er zeigt keinerlei Bindung an nicht-infizierte bovine Zellen.

Die alleinige Verwendung von MAK Klon 1 als Fangantikörper im Elisa zum BCV-Nachweis war jedoch weniger effizient als eine Kombination dieses MAK mit dem MAK 4H12. Dabei war die Verdünnung des MAK 4H12 so hoch gewählt, daß eine Bindung von Proteinen nicht-infizierter Rinderzellen ausgeschlossen war. Fang- und Nachweisantikörper waren so eingestellt, daß mit negativen Materialien keinerlei Hintergrundreaktionen zustande kamen. Dies gelang jedoch nur mit kaolingereinigtem Kaninchenimmenserum. Auch Crouch et al. (1984) berichten, daß die Verwendung zweier unterschiedlicher MAK als Fangantikörper bessere Ergebnisse bringt als die Verwendung eines MAK. Dabei konnten diese Autoren außerdem mit Hilfe der Immunopräzipitation zeigen, daß ihre verwendeten MAK an unterschiedliche Epitope, die auf zwei Polypeptiden lokalisiert sind, binden. Dagegen gelang hier der Nachweis der bekannten Epitope auf einzelnen Proteinen mit der Immunoblotting-Technik nicht. Möglicherweise werden diese Epitope nach Denaturierung nicht mehr erkannt oder es handelt sich um diskontinuierliche Epitope. Die Ergebnisse des Kompetitions-Elisas mit biotinylierten MAK belegen jedoch eindeutig, daß die MAK Klon 1 und 4H12 unterschiedliche Epitope erkennen.

Der hier beschriebene Elisa zum Nachweis von BCV-Antigen in Kotproben bietet einige Vorteile gegenüber anderen Verfahren zur Coronavirus-Diagnose. Zunächst ist der Test objektiv ablesbar, sowohl mit bloßem Auge, als auch, und

natürlich besser, photometrisch. Besonders gegenüber dem EM sticht diese Objektivität hervor, da die Abwägung zwischen "echten" Coronaviren und "coronavirus-like-particles" entfällt.

Eine gewisse Subjektivität war auch bei der Routine-diagnostik zum BCV-Nachweis nach Bachmann (1982, unveröffentlicht) gegeben, bei der Kotproben mit HA-Titern unter 1:100 als negativ gewertet wurden. Im Elisa waren jedoch 37 von 234 solcher Proben positiv. Erklärbar sind die Ergebnisse des Elisa durch seine höhere Empfindlichkeit, was auch bei der vergleichende Untersuchung zellkulturadaptierter Stämme deutlich wird. Hier liegen die Elisa-Titer vier- bis achtfach über den HA-Titern.

Die höhere Empfindlichkeit des Elisa im Vergleich zur HA könnte auch die positive Reaktion von 39 aus 114 HA-positiven/HAH-negativen Proben erklären. Dagegen liegt die Ursache für den BCV-Nachweis mit Elisa bei nur 68 von 95 HAH-positiven Kotproben vermutlich in technischen Problemen bei der Durchführung des HA/HAH-Tests. Dabei ist besonders der Zeitpunkt der Ablesung der HAH-Reaktion von Bedeutung. Dieser Test muß ausgewertet werden, wenn die Kontrollerythrozyten vollständig sedimentiert sind. Im Rahmen der Routine-Diagnostik wurde dagegen häufig über Nacht bei 4°C inkubiert und erst dann abgelesen. Dadurch war es möglicherweise zur Ablesung falsch positiver Ergebnisse gekommen.

Die Verwendung von TMB anstelle von OPD als Indikator im BCV-Antigen-ALISA erbrachte keine Nachteile, es wurden die selben oder gar höhere Extinktionen erzielt. Da OPD möglicherweise kanzerogen ist, während eine solche Vermutung bei TMB nicht existiert, sollte OPD als Indikator nicht mehr verwendet werden. Außerdem müssen OPD-haltige Lösungen lichtgeschützt bei -20°C aufbewahrt werden und sind dennoch nur wenige Wochen haltbar; dann kommt es zu starken Hintergrundreaktionen. TMB in DMSO kann dagegen bei 4°C aufbewahrt werden, auch nach längerer Lagerung bleibt die Reaktion stabil. Dies deckt sich mit Angaben von Beards et al. (1984).

Ein Vorteil des Elisa liegt in der raschen Durchführung

des Tests. Auf einer Platte kann nach 3,5 Stunden das Ergebnis für 20-40 Proben (bei Einzelansatz sogar mehr) abgelesen werden. Außerdem sind die vom BCV-Elisa nachgewiesenen Epitope offensichtlich weniger wärmelabil als das Hämagglutinin. So waren die Elisa-Titer von Kontrollproben auch nach längerer Lagerung bei 4°C bzw. mehrmaligem Auftauen unverändert. Allerdings wurden zu dieser Fragestellung keine systematischen Untersuchungen durchgeführt.

5. Zusammenfassung

Zunächst wurde versucht, die Isolierung boviner Coronaviren (BCV) aus Kotproben zu optimieren. Trotz Variierung der angewandten Technik gelang eine Virusvermehrung nur bei 4 von 41 untersuchten HA/HAH - positiven Proben. Darauf wurde die Entwicklung eines Elisa zum Nachweis von BCV - Antigen begonnen. Zunächst wurden Immunsereen in Meerschweinchen und Kaninchen hergestellt, außerdem wurden Antikörper aus dem Dotter immunisierter Hühner extrahiert. Die alleinige Verwendung von polyklonalen Antisereen führte jedoch zu keinen befriedigenden Ergebnissen, da sowohl die Empfindlichkeit als auch die Spezifität zu gering waren.

Deshalb wurden monoklonale Antikörper gegen den zellkulturadaptierten BCV - Stamm V270/83 hergestellt. Diese MAK eigneten sich am besten zur Plattenbeschichtung, besonders eine Kombination der MAK 4H12 und Klon 1. Diese MAK erkennen im Kompetitions - Elisa unterschiedliche Epitope, die Lokalisation dieser Epitope auf BCV - Polypeptiden ließ sich in Immunoblotting - Experimenten allerdings nicht darstellen.

Als Nachweisantikörper im Elisa erwies sich Kaolin - behandeltes Kaninchenimmunsereum im indirekten Verfahren als allen anderen getesteten Antikörpern überlegen. Die Verwendung von Peroxidase - markiertem Immunsereum oder biotinylierten MAK resultierte dagegen in einer wesentlich geringeren Empfindlichkeit.

Die Empfindlichkeit des BCV - Elisa wurde durch vergleichende Untersuchung zellkulturadaptierter BCV - Stämme im Elisa und der HA überprüft. Dabei wurden im Elisa bis zu 8fach höhere Titer erzielt. Bei der Untersuchung von 443 Kotproben, die bereits mit der HA/HAH - Technik getestet worden waren, ergab sich eine relativ hohe Übereinstimmung bei Proben, die in beiden Verfahren deutlich positiv oder negativ gewertet worden waren (84,2% bzw. 71,5%). Dagegen war die Übereinstimmung bei Proben, die niedrige HA - Titer besaßen, aber in der HAH - Reaktion negativ gewertet worden waren, nur bei 65,8%.

Schließlich wurden andere Coronaviren der antigenetischen Gruppen I und II mit dem BCV - Elisa untersucht. Coronaviren der Gruppe II reagierten hier überhaupt nicht; innerhalb der Gruppe I zeigte das humane Coronavirus OC-43 eine mit bovinen Coronaviren identische Reaktion, während HEV nur schwach reagierte.

Summary

Elisa for the detection of bovine coronavirus antigens based on monoclonal and polyclonal antibodies: comparison with other diagnostic procedures

in order to establish an Elisa for the diagnosis of bovine coronavirus (BCV) first polyclonal antisera were prepared in guinea pigs and rabbits. Additionally, antibodies were extracted from yolk of immunized hens. The use of polyclonal antibodies only did not result in satisfactory assays; both sensitivity and specificity were too low.

Therefore, monoclonal antibodies (mab) were produced against the cell culture - adapted BCV - strain V270/83. These mabs were best suited as catching - antibodies, especially a combination of two mabs, 4H12 and Clone 1. 4H12 and Clone 1 recognize different epitopes of BCV as determined by competition - Elisa. However, it was not possible to localize these epitopes on BCV - polypeptides by immunoblotting.

Best results were obtained when Kaolin - treated rabbit immune serum was used as detecting antibody in an indirect assay. The use of peroxidase conjugated antiserum or biotinylated mabs resulted in a sharp decrease of sensitivity.

Cell culture adapted BCV - strains were tested by Elisa and HA in order to compare the relative sensitivity of these assays. Elisa - titers were up to 8 times higher than HA - titers.

443 fecal samples that had already been tested by the conventional HA/HI technique were assayed by Elisa. A good correlation (84.2% and 71.6%) of the results of both tests was obtained for samples scored clearly positive or negative by both tests. The agreement of the results dropped to 65.8% for samples with low HA-titers that had been scored negative by HI. Finally, other coronaviruses of the antigenic groups I and II were tested by Elisa. Group II coronaviruses did not react at

all. Within group I HEV reacted only weakly whereas the reaction of HCV OC-43 was identical to BCV.

6. Literaturverzeichnis

- AKASHI, H., Y. INABA, Y. MIURA, K. SATO, S. TOKUHISA, M. ASAGI, Y. HAYASHI, 1981: Propagation of the Kakegawa strain of bovine coronavirus in suckling mice, rats and hamsters.
Arch. Virol. 67, 367-370.
- AVRAMEAS, S., T. TERNYNCK, 1971: Peroxidase-labelled antibody and fab conjugates with enhanced intracellular penetration.
Immunochemistry 8, 1175-1179.
- BACHMANN, P.A., 1979: Rotavirusnachweis in Faezes: Erfahrungen mit dem Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).
Zbl. Vet. Med. B 26, 836-843.
- BADE, H., H. STEGEMANN, 1984: Rapid method of extraction of antibodies from hen egg yolk.
J. Immun. Meth. 72, 421-426.
- BALJER, G., P.A. BACHMANN, 1980: Nachweis enteropathogener Escherichia coli-Stämme und Rotaviren in Kotproben von Kälbern mit Diarrhoe.
Zbl. Vet. Med. B 27, 606-615.
- BALJER, G., W. EICHHORN, E. GÖBEL, M. WOLF, P.A. BACHMANN, 1987: Vorkommen und Verbreitung wichtiger Durchfallerreger bei neugeborenen Kälbern in Süddeutschland im Zeitraum 1984 bis 1986.
Tierärztl. Umschau 42, 56-65.
- BATTAGLIA, M., N. PASSARANI, A.D. MATTEO, G. GERNA, 1987: Human enteric coronavirus: further characterization and immunoblotting of viral proteins.
J. Infect. Dis. 155, 140-143.

- BEARDS, G.M., A.D. CAMPBELL, N.R. COTTRELL, J.S.M.
PEIRIS, N. REES, R.C. SANDERS, J.A. SHIRLEY, H.C.
WOOD, T.H. FLEWETT, 1984: Enzyme-Linked
Immunosorbent Assays Based on Polyclonal and
Monoclonal Antibodies for Rotavirus Detection.
J. clin. Microbiol. 19, 248-254.
- BRIDGER, J., C. CAUL, S.I. EGGLESTONE, 1978: Replication
of an enteric bovine coronavirus in intestinal
organ cultures.
Arch. Virol. 57, 43-51.
- CROUCH, C.F., T.J.G. RAYBOULD, S.D. ACRES, 1984:
Monoclonal antibody capture enzyme-linked
immunosorbent assay for detection of bovine enteric
coronavirus.
J. clin. Microbiol. 19, 388-393.
- CZERNY, C.P., 1985: Zellkulturadaptierung des humanen
Coronavirus OC-43 und dessen epizootiologische
Bedeutung.
Diss. Vet. Med., München.
- DAVIES, H.A., 1982: Electron microscopy and immune
electron microscopy for detection of
gastroenteritis viruses.
in: Virus infections of the gastrointestinal tract,
TYRRELL, D.A.J., A.Z. KAPIKIAN, Eds., Marcel Dekker,
New York, Basel, 37-49.
- DEA, S., R.S. ROY, M.E. BEGIN, 1979:
Counterimmunoelectrophoresis for detection of
neonatal calf diarrhea coronavirus: Methodology and
comparison with electron microscopy.
J. Clin. Microbiol. 10, 240-244.
- DEA, S., R.S. ROY, M.A.S.Y. ELAZHARY, 1983: Virus-like
particles 45 to 65 nm in intestinal contents of
neonatal calves.
Can. J. Comp. Med. 47, 88-91.

- ELLENS, D.J., J.A.M.V. BALKEN, P.D. LEEUW, 1978:
Diagnosis of bovine coronavirus infections with
haemadsorption-elution-haemagglutination assay
(HEHA) and with enzyme linked immunosorbent assay
(ELISA).
Proc. 2nd Int. Symp. Neonatal Diarrhoea, 321-330.
- ESPINASSE, J., M. VISO, A. LAVAL, M. SAVEY, C.L. LAYEC,
1982: Winter dysentery: a coronavirus-like agent in
the faeces of beef and dairy cattle with diarrhoea.
Vet. Rec. 110, 385.
- FAZEKAS DE ST.GROTH, S., D. SCHEIDEGGER, 1980: Production
of monoclonal antibodies: Strategy and tactics.
J.Immun.Meth. 35, 1-21.
- GARWES, D.J., 1982: Coronavirus in animals.
in: Virus infections of the gastrointestinal tract,
TYRRELL, D.A.J., KAPIKIAN, A.Z., Eds., Marcel Dekker,
New York, Basel.
- GUY, J.S., D.A. BRIAN, 1979: Bovine coronavirus genome.
J. Virol. 29, 293-300.
- HESS, R.G., P.A. BACHMANN, G. BALJER, A. MAYR, A.
POSPISCHIL, G. SCHMID, 1984: Synergism in
experimental mixed infections of newborn colostrum-
deprived calves with bovine rotavirus and
enterotoxigenic escherichia coli (ETEC).
Zbl. Vet. Med. B 31, 585-596.
- HOGUE, B.G., B. KING, D.A. BRIAN, 1984: Antigenic
relationships among proteins of coronavirus human
respiratory coronavirus OC43 and mouse hepatitis
coronavirus A59.
J. Virol. 51, 384-388.
- HORNER, G.W., R. HUNTER, C.A. KIRKBRIDE, 1976:
A coronavirus-Like agent present in feces of cows
with diarrhoea.
N.Z. Vet. J. 23, 98

- HORZINEK, M.C., M. WEISS, 1984: Toroviridae: a taxonomic proposal .
Zbl. Vet. Med. B 31, 649-659.
- HUBERT, P., 1985: Charakterisierung von monoklonalen Antikörpern gegen Rotaviren und ihre Anwendung in der Diagnostik.
Diss. Vet. Med., München
- JOHNSTONE, A., R. THORPE, 1982: Immunochemistry in practice.
Blackwell Scientific Publications, Oxford London Edinburgh.
- KEARNEY, J.F., A. RADBRUCH, B. LIESEGANG, K. RAJEWSKY, 1979: A new mouse myeloma cell line which has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody secreting cell lines.
J. Immunol. 123, 1548-1550.
- KRAUSE, P.J., J.S. HYAMS, P.J. MIDDLETON, V.C. HERSON, J. FLORES, 1983: Unreliability of rotazyme ELISA test in neonates .
J. Pediatr. 10, 259-.
- KRAUSS, M., 1985: Vergleichende Untersuchungen über den Nachweis von bovinen Rotaviren im Kot.
Diss. Vet. Med., München
- LAPPS, W., B. HOGUE, D.A. BRIAN, 1987: Sequence analysis of the bovine coronavirus nucleocapsid and matrix protein genes.
Virology 157, 47-57.
- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, L. FARR, R.J. RANDALL, 1951:
Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265.

- LU CHENGPING, 1985: Isolierung, Charakterisierung und
Epizootiologie boviner Coronaviren.
Diss. Med. vet., München
- LÄMMLI, U.K., 1970: Cleavage of structural proteins
during the assembly of the head of bacteriophage
T 4.
Nature 227, 680-685.
- MARSOLAIS, G., R. ASSAF, C. MONTPETIT, P. MAROIS, 1978:
Diagnosis of viral agents associated with neonatal
calf diarrhea.
Canad. J. comp. Med. 42, 168-171.
- MATTHEWS, R.E.F., 1982: Classification and nomenclature
of viruses.
Intervirology 17, 1-199.
- MAYR, A., P.A. BACHMANN, B. BIBRACK, G. WITTMANN, 1974:
Virologische Arbeitsmethoden. Bd. 2 : Serologie.
VEB Gustav Fischer Verlag, Jena.
- MCNULTY, M.S., D.G. BRYSON, G.M. ALLAN, E.F. LOGAN, 1984:
Coronavirus infection of the bovine respiratory
tract.
Vet. Microbiol. 9, 425-434.
- MEBUS, C.A., E.L. STAIR, M.B. RHODES, M.J. TWIEHAUS,
1973: Neonatal calf diarrhea:
Propagation, attenuation, and characteristics of a
coronavirus-like agent.
Amer. J. Vet. Res. 34, 145-150.
- MERRIL, C.R., D. GOLDMAN, S.A. SEDMAN, M.H. EBERT, 1981:
Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide
gels shows regional variation in cerebrospinal fluid
proteins.
Science 211, 1437-1438.

- NAGY, V.B., L. CSONTOS, V. PALFI, G.Y. NAGY, M. BOZSO,
1986: Polyätiologische diagnostische Erfahrungen
bei Kälberdurchfällen im ersten Lebensmonat.
Wien. Tierärztl. Mschr. 73, 181-184.
- PEDERSEN, N.C., J. WAND, W.L. MENGELING, 1978: Antigenic
relationship of the feline infections peritonitis
virus to coronaviruses of other species.
Arch. Virol. 58, 45-53.
- PENSAERT, M.B., P. DEBOUCK, D.J. REYNOLDS, 1981: An
immunoelectron microscopic and immunofluorescent
study on the antigenic relationship between the
coronavirus-like agent, CV777, and several
coronaviruses.
Arch. Virol. 68, 45-52.
- PETERS, J.H., H. BAUMGARTEN, M. SCHULZE, 1985:
Monoklonale Antikörper: Herstellung und
Charakterisierung.
Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York Tokyo.
- REYNOLDS, D.J., D. CHASEY, A.C. SCOTT, J.C. BRIDGER,
1984: Evaluation of ELISA and electron microscopy
for the detection of coronavirus and rotavirus in
bovine faeces.
Vet. Rec. 114, 397-401.
- REYNOLDS, D.J., J.H. MORGAN, N. CHANTER, P.W. JONES, J.C.
BRIDGER, T.G. DEBNEY, K.J. BUNCH, 1986:
Microbiology of calf diarrhea in southern Britain.
Vet. Rec. 119, 34-38.
- ROTBART, H.A., R.H. YOLKEN, W.L. NELSON, D. DAVIS, M.H.
ROE, M.J. LEVIN, 1985: Confirmatory testing of
rotazyme results in neonates.
J. Pediat 107, 289-292.

- SANEKATA, T., Y. YOSHIDA, K. ODA, 1979: Detection of rotavirus from feces by reversed passive haemagglutination method.
J. Clin. Pathol. 32, 963.
- SATO, K., Y. INABA, H. KUROGI, E. TAKAHASHI, K. SATODA, T. OMORI, M. MATUMOTO, 1977: Hemagglutination by calf diarrhea coronavirus.
Vet. Microbiol. 2, 83-87.
- SATO, K., Y. INABA, Y. MIURA, S. TOKUHISA, H. AKASHI, T. SHINOZAKI, M. MATUMOTO, 1981: Neutralizing antibody to calf diarrhea coronavirus in various animal species in Japan.
Microbiol. Immunol. 25, 623-625.
- SATO, K., Y. INABA, S. TOKUHISA, Y. MIURA, N. KANEKO, M. ASAGI, M. MATUMOTO, 1984: Detection of bovine coronavirus in feces by reversed passive hemagglutination. Arch. Virol. 80, 20-31.
- SHARPEE, R.L., C.A. MEBUS, E.P. BASS, 1976:
Characterization of a calf diarrheal coronavirus.
Amer. J. Vet. Res. 37, 1031-1041.
- SIDDELL, S.T., W. WEGE, V.T. MEULEN, 1982: The structure replication of coronaviruses.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 99, 131-163.
- SNODGRASS, D.R., M.L. SMITH, F.L. KRAUTIL, 1982:
Interaction of rotavirus and enterotoxigenic Escherichia coli in conventionally-reared dairy calves. Vet. Microbiol. 7, 51-60.
- SNODGRASS, D.R., H.R. TERZOLO, D. SHERWOOD, J. CAMPBELL, J.D. MENZIES, B.A. SYNGE, 1986: Aetiology of diarrhea in young calves.
Vet. Rec. 119, 31-39.

- STAIR, E.L., M.B. RHODES, R.G. WHITE, C.A. MEBUS, 1972:
Purification and electron microscopy of a
coronaviruslike agent.
Amer. J. Vet. Res. 33, 1147-1155.
- STORZ, J., R. ROTT, 1981: Reactivity of antibodies in
human serum with antigens of an enteropathogenic
bovine coronavirus.
Med. Microbiol. Immunol. 169, 169-178.
- STOTT, E.J., L.H. THOMAS, J.C. BRIDGER, N.J. JEBBETT,
1976: Replication of a bovine coronavirus in organ
cultures of foetal trachea.
Vet. Microbiol. 1, 65-69.
- TAKAHASHI, E., Y. INABA, K. SATO, Y. ITO, H. KUROGI, H.
AKASHI, K. SATODA, T. OMORI, 1980: Epizootic
diarrhoea of adult cattle associated with a
coronavirus like agent.
Vet. Microbiol. 5, 151-154.
- THOMAS, L.H., R.N. GOURLAY, E.J. STOTT, C.J. HOWARD, J.C.
BRIDGER, 1982: A search for new micro-organisms in
calf pneumonia by the inoculation of gnotobiotic
calves.
Res. Vet. Sci. 33, 170-182.
- TIMONEY, P.J., M.M. HAMMOND, L.A. PETERSON, L.A. JONES,
S.G. SIEBER, 1983: Fringed virus-like particles in
diarrhoeic faeces from calves and dogs.
Vet. Rec. 113, 318-319.
- TOWBIN, H., T. STAEGELIN, J. GORDON, 1979:
Electrophoretic transfer of proteins from
polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets:
Procedure and some applications.
Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 4350-4354.
- VAUTHEROT, J.F., 1981: Plaque assay for titration of
bovine enteric coronavirus.
J. gen. Virol. 56, 451-455.

- WEGE, H., S.T. SIDDELL, V.T. MEULEN, 1982: The biology and pathogenesis of coronaviruses.
Curr. Top. Microbiol. Immunol. 99, 165-200.
- WOODE, G.N., J.C. BRIDGER, 1978: Isolation of small viruses resembling astroviruses and caliciviruses from acute enteritis of calves.
J. Med. Microbiol. 11, 441-452.
- WOODE, G.N., D.E. REED, P.M. RUNNELS, M.A. HERRIG, H.T. HILL, 1982: Studies with an unclassified virus isolated from diarrheic calves.
Vet. Microbiol. 7, 221-240.
- WOODE, G.N., L.J. SAIF, M. QUESADA, N.J. WINAND, J.F. POHLENZ, N. KELSO GOURLEY, 1985: Comparative studies on three isolates of breda virus.
Amer. J. Vet. Res. 46, 1003-1010.
- ZISSIS, G., J.P. LAMBERT, 1978: Different serotypes of human rotaviruses.
Lancet. i, 38-39.

Herrn Prof.Dr.Dr.h.c.mult.A.Mayr danke ich herzlich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die Überlassung des Themas.

Herrn Dr.W.Eichhorn gilt mein besonderer Dank für seine Unterstützung.

Herrn Dr.C.P.Czerny, Herrn Dr.H.Meyer, Herrn Dr.P.Hübert danke ich für das Interesse und die vielen Hinweise bei der Anfertigung der Arbeit. Allen Mitarbeitern der Isolierabteilung danke ich für das angenehme Arbeitsklima und die stete Unterstützung.

Besonders in Erinnerung behalten möchte ich Herrn Prof.Dr.P.A. Bachmann für seine Hilfe beim Erlernen von Grundtechniken.

Lebenslauf

Name: Chen Huan Chun
Geburtsdatum: 20.3.1953
Geburtsort: Hubei, China
1959 - 1965 Grundschule
1965 - 1969 Mittelschule
1970 - 1971 Praktikant
1972 - 1975 Studium der Veterinärmedizin an der
Huazhong-Agrar-Universität
1976 - 1978 Assistent für Chirurgie an der Tier-
ärztlichen Fakultät der Huazhong-Agrar-
Universität
1979 - 1980 Besuch des Kurses für Hochschullehrer
1980 - 1981 Besuch des Kurses für Virologie
1981 - 1982 Besuch des Deutschkurses
1982 - 1984 Assistent für Microbiologie der tier-
ärztlichen Fakultät der
Huazhong-Agrar-Universität
1984 - 1985 Besuch des Goethe-Institutes in Freiburg
Ab Febr.1985 Weiterbildung und Doktorarbeit bei
Prof.Dr.Dr.h.c.mult.A.Mayr.

